

**ZPK : UNE SÉRINE/THRÉONINE KINASE IMPLIQUÉE DANS LE CONTRÔLE DE LA
PROLIFÉRATION CELLULAIRE**

par

Pascal Bergeron, B.Sc.

**mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)**

**FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE**

Sherbrooke, Québec, Canada, juin 1997



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-35659-0

SOMMAIRE

ZPK est une sérine/thréonine kinase qui semble démontrer une implication dans la régulation de la croissance et la différenciation cellulaire. Des études d'expression employant des vecteurs arborant l'ADNc de *ZPK* ont été réalisées chez les NIH 3T3, afin de déterminer si cette protéine kinase avait réellement une action potentielle sur le contrôle de la croissance cellulaire. Deux systèmes différents qui permettent la sur-expression ont été utilisés : un premier amenant une expression constitutive et un second réalisant une expression inductible par un glucocorticoïde. L'expression stable de *ZPK*, exercée de façon constitutive, mène à une réduction dramatique de la capacité de croissance des cellules. Cette diminution a été mesurée par un essai de formation de colonies en culture monocouche. Par opposition, la sur-expression de l'ADNc de *ZPK* contenant une mutation du site de fixation de l'ATP, n'affecte en rien l'expansion des cellules transfectées. L'utilisation d'un vecteur inductible a permis de contrôler l'expression de *ZPK* et ainsi démontrer par des études de croissance et de mesure de synthèse d'ADN, que *ZPK* avait réellement un effet négatif sur la croissance des NIH 3T3. L'utilisation d'une construction contenant le déterminant antigénique HA couplé à *ZPK* a permis de démontrer par Western blot et immunohistochimie, l'expression *in vivo* de la protéine réalisée à partir de l'ADNc. Ces résultats suggèrent que la protéine *ZPK* peut agir comme régulateur de la croissance cellulaire et que cette fonction serait médiée en partie par l'activité kinase intrinsèque à la protéine.

Le 25/2 1998, le jury suivant a accepté ce mémoire, dans sa version finale.

Président-rapporteur: M. Claude Déry

Membre: M. Benoît Coulombe

Membre: M. Richard Blouin

REMERCIEMENTS

Le premier mot de remerciement revient à Hélène, ma conjointe, pour sa très grande complicité et son support tout au long de mes études. Des remerciements importants reviennent également à ma famille ainsi qu'à ma belle-famille qui ont su m'encourager à persévérer durant ces deux dernières années. Je remercie également M. Richard Blouin, Ph.D. ainsi que mes conseillers M. Claude Déry, Ph.D. et M. Benoît Coulombe, Ph.D. pour m'avoir permis de réaliser ces travaux sous leur supervision dans un encadrement formateur et très enrichissant. Finalement, un mot revient à mes consoeurs de travail Nathalie et Mélanie pour leur aide précieuse et le plaisir que j'ai eu à travailler avec elles.

Ce travail a été supporté par le programme de Bourses d'études supérieures ÉS A du Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	ii
REMERCIEMENTS.....	iii
TABLE DES MATIÈRES	iv
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	x
INTRODUCTION	1
 CHAPITRE 1 - MATÉRIEL ET MÉTHODES	 30
1.1 Techniques de l'ADN recombinant	30
1.1.1 Souches de cellules	30
1.1.2 Croissance des cultures bactériennes	31
1.1.3 Cellules compétentes et transformation	31
1.1.4 Manipulations de l'ADN	32
1.1.4.1 Digestion.....	32
1.1.4.2 Ligation.....	32
1.1.4.3 Préparation d'ADN plasmidiques	33
1.1.4.4 Purification des fragments d'ADN.....	33
1.2 Mutagenèse <i>in vitro</i> dirigée par oligonucléotide.....	34
1.2.1 Obtention de l'ADN simple brin	35
1.2.2 Mutagenèse	35
1.3 Transcription/traduction <i>in vitro</i>	36
1.4 Vecteurs d'expression eucaryotes	37
1.5 Lignées cellulaires et conditions de culture	38
1.5.1 Transfection.....	38
1.5.1.1 Transfection transitoire et transfection stable	39

1.5.2 Clones inductibles : culture et expression.....	40
1.5.2.1 Expression (dot blot)	41
1.5.2.2 Courbes de croissance	41
1.5.2.3 Mesure de la synthèse d'ADN.....	42
1.6 Construction et expression de ZPK contenant l'épitope HA.....	42
1.6.1 Polymérisation en cascade (PCR).....	42
1.6.2 Western Blot.....	43
1.6.3 Immunohistochimie.....	44
CHAPITRE 2 - RÉSULTATS.....	45
2.1 Synthèse <i>in vitro</i> de ZPK.....	45
2.2 Construction d'une protéine ZPK contenant le déterminant antigénique HA.....	47
2.3 Expression de ZPK-HA.....	47
2.4 ZPK inhibe la formation de colonies chez la lignée cellulaire NIH 3T3.....	49
2.5 Dose-dépendance de l'activité inhibitrice de ZPK sur la croissance.....	53
2.6 Le site de fixation de l'ATP de ZPK est nécessaire à l'inhibition de la croissance	53
2.7 Démonstration de l'inhibition de croissance par sur-expression de ZPK induite par la dexaméthasone.....	58
2.7.1 Démonstration de l'arrêt de croissance des populations inductibles de NIH 3T3	61
2.7.2 Effet de l'expression de ZPK sur le taux de synthèse d'ADN mesuré par incorporation de [³ H]thymidine	63
CHAPITRE 3 - DISCUSSION.....	66
3.1 La sur-expression de ZPK empêche considérablement la croissance des NIH 3T3	68
3.2 L'inhibition de la croissance requiert un site de fixation de l'ATP intact.....	69
3.3 ZPK dans la signalisation cellulaire	71
3.4 Inhibition de la croissance par expression induite de ZPK.....	73
3.5 ZPK et la différenciation cellulaire ?	75

CONCLUSION.....	79
ANNEXE 1	82
RÉFÉRENCES	85

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine tri-phosphates
CDKs	« cyclin-dependant kinases »
CMV	cytomégalovirus
CRIB	« Cdc42/Rac1 interactive binding region »
dex	dexaméthasone
DMEM	« Dulbecco's modified Eagle medium »
DMSO	diméthyle sulfoxide
FBS	« fetal bovine serum »
GTP	guanosine tri-phosphates
HA	épitope du peptide de l'hémagglutinine du virus de l'influenza humain
kpb	1000 paires de bases
LMP	« low melting point temperature agarose »
NBT	sel de nitrobleu tetrazolium
neo	néomycine
oligo	oligonucléotide
pb	paires de bases
PCR	polymérisation en cascade
PKs	protéines kinases
rNTPs	ribonucléotides tri-phosphates
RPM	révolution par minute
SDS	dodécyle sulfate de sodium
SDS-PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS
SH2	« <i>src</i> homology domain 2 »

SH3	« <i>src</i> homology domain 3 »
SV40	« simian virus 40 »
ufc	unité de formation de colonies
UTP	uracile tri-phosphate-OH
X-Phosphate	sel de toluidinium, 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
ZPK	gène « zipper protein kinase »
ZPK	protéine « zipper protein kinase »
ZPK(K/R)	mutant du site de fixation de l'ATP (lysine 185 devenue une arginine)

LISTE DES TABLEAUX

1. Le code génétique : les acides aminés et leurs symboles p.9
2. Enzymes utilisées, conditions de réaction et fournisseurs..... p.32

LISTE DES FIGURES

1.	Représentation de la structure et du repliement d'un domaine kinase	p.8
2.	Voies de transduction : les MAPKs.....	p.16
3.	Comparaison des différents sites de régulation de l'activation des MAPKs	p.19
4.	Structure schématique de la protéine ZPK	p.23
5.	Modèle hypothétique d'activation de ZPK.....	p.25
6.	Analyse de ZPK par transcription/traduction <i>in vitro</i>	p.46
7.	Construction d'une protéine ZPK contenant le déterminant antigénique HA	p.48
8.	Observation de l'expression de ZPK-HA.....	p.50
9.	Inhibition de la croissance cellulaire de ZPK chez les NIH 3T3	p.52
10.	Effet dose-dépendante de ZPK sur la croissance cellulaire	p.54
11.	Mutant du site de fixation de l'ATP pour ZPK (K185R).....	p.56
12.	ZPK requiert un site de fixation de l'ATP intact pour inhiber la croissance cellulaire	p.57
13.	Démonstration de l'expression inductible du vecteur pGRE5.2-ZPK	p.60
14.	Inhibition de la croissance par expression inductible de ZPK	p.62
15.	Mesure du taux d'incorporation de [³ H]thymidine dans les cellules NIH 3T3 exprimant de façon inductible ZPK	p.64

INTRODUCTION

L'évolution des organismes multicellulaires dépend de l'habileté des cellules eucaryotes d'exprimer l'information héréditaire de différentes façons et d'exercer des fonctions en coopération dans un ensemble collectif. La régulation de ces fonctions biologiques et leur maintien dans un état physiologique sont des phénomènes importants pour ces organismes. Les organismes multicellulaires adultes sont comparables à une sorte d'écosystème en évolution où chaque génération de cellules succède la précédente sans changer le rôle de l'organisation du système. La compréhension de l'ensemble des circonstances permettant aux organismes de conserver cette homéostasie de leurs systèmes devient une démarche très importante.

L'homéostasie cellulaire est régulée, en grande partie, par la balance entre la prolifération, la différenciation cellulaire, l'arrêt de croissance et la mort cellulaire programmée (Liebermann *et al.*, 1995). Ces processus étant étroitement liés chez ces organismes complexes, on peut se demander comment s'exerce le contrôle permettant une balance en équilibre. L'équation contribuant à cet équilibre est maintenue en place par la contribution de nombreux signaux cellulaires. Chez les organismes multicellulaires, les cellules sont exposées à des milliers de signaux différents venant de leurs environnements extracellulaires. Ces signaux peuvent être solubles, attachés à la matrice extracellulaire, liés à la surface des cellules voisines et peuvent agir dans un nombre considérable de combinaisons. Une cellule peut répondre à ce mélange de signaux de façon sélective en accord avec son caractère spécifique acquis suivant la spécialisation cellulaire progressive de son développement. Elles possèdent différents récepteurs et une machinerie intracellulaire qui permet l'interprétation de l'information qu'elles reçoivent. Les signaux reçus induisent l'enclenchement d'une réponse interne, transmise par les voies de transduction. Ainsi, une cellule peut être programmée pour répondre à un groupe de signaux par la différenciation tandis que, sur une autre population, ces mêmes signaux n'auront aucun effet. Les cellules sont dépendantes des combinaisons de signaux qui affectent leurs environnements.

Toutefois, il faut garder à l'esprit qu'une population donnée de cellules exprime des gènes qui permettent d'intégrer la réponse requise en fonction des signaux reçus. On voit ainsi qu'une molécule de signalisation peut avoir des effets divergents ou opposés sur des cellules différentes selon le bagage génétique exprimé.

L'homéostasie cellulaire est donc un phénomène hautement complexe, demandant l'intégration de plusieurs domaines de connaissances pour en améliorer la compréhension. Le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire ainsi que des phénomènes s'associant à la survie cellulaire sont les processus qui obtiennent la plus grande popularité au niveau de la recherche.

La différenciation cellulaire

La différenciation cellulaire est un des principaux mécanismes de maintien de l'organisation cellulaire et du renouvellement de celui-ci. La différenciation est, chez les organismes multicellulaires, un peu ce que l'université est à notre société : elle permet à l'organisme de se spécialiser et de former, via différentes orientations, de nombreuses variétés cellulaires qui ont chacune leur place dans l'organisme. Deux processus cellulaires étroitement reliés sont simultanément sollicités suivant l'induction de la différenciation : 1) l'inhibition de croissance qui est ultimement menée jusqu'à l'arrêt de croissance et 2) la progression régulée de la cellule dans les stages successifs de différenciation (Liedermann *et al.*, 1995). Dans bien des cas, cela se caractérise par un blocage du cycle cellulaire dans la transition entre les phases G1 et S au profit de l'engagement vers d'autres fonctions spécialisées. On peut ainsi attribuer à la différenciation, la caractéristique de phénomène inhibant la prolifération induite par l'expression de gènes cibles. D'autres facteurs vont permettre le maintien de l'état de différenciation terminale et/ou l'incapacité de reprendre la voie de la division cellulaire (Liebermann *et al.*, 1995). Cette différenciation cellulaire terminale est, dans de nombreux cas, couplée à l'arrêt de la

prolifération ainsi qu'à l'apoptose. L'implication de ces gènes, dans l'une ou l'autre des étapes de la différenciation, peut être établie difficilement étant donné que les deux processus sont successifs et s'enchaînent rapidement. Donc, l'aboutissement de la différenciation cellulaire représente la conversion des cellules indifférenciées et en prolifération, en cellules se caractérisant par un arrêt de croissance, une grande différenciation et l'acquisition de fonctions spécialisées (Alberts, 1994).

Si on prend un organisme supérieur à un moment précis et que l'on regarde l'état des cellules qui le compose, on retrouvera selon les rôles, leurs positions ou leurs fonctions, des états de prolifération et de différenciation différents. Ce phénomène requiert l'intervention de signaux extracellulaires spécifiques ainsi que l'expression par chacune des populations cellulaires de gènes différents. On sait que tous les niveaux impliqués dans la transmission des signaux sont mis à contribution. Les récepteurs, les protéines cytoplasmiques et les protéines nucléaires peuvent tous avoir des rôles reliés à la différenciation. La différenciation s'associe également de façon intégrale au développement, à l'organogenèse et aux processus de régénération. Les gènes, dont l'expression est impliquée dans la différenciation, sont relativement nombreux et les modèles *in vitro* nous permettent aujourd'hui d'étudier l'expression de gènes et le rôle de ceux-ci dans la différenciation et la prolifération.

Plusieurs populations de cellules différenciées chez les vertébrés sont sujettes à un renouvellement (« turnover ») qui est tributaire à la fois de la mort et de la division cellulaire. Dans certains cas, comme chez les hépatocytes du foie, la cellule pleinement différenciée se divise simplement pour produire des cellules filles du même type. La prolifération et la survie des hépatocytes sont contrôlées pour maintenir le nombre approprié de cellules dans l'organe. Que ce soit lors de l'ablation d'une partie du foie ou lors d'une croissance induite de façon transitoire, les mécanismes de contrôle ramènent le nombre de cellules dans la balance appropriée. D'autres tissus, spécialement ceux avec un renouvellement très rapide comme

l'épithélium intestinal et la couche de l'épiderme de la peau sont renouvelés à partir de cellules souches. Les cellules souches de ces tissus sont, par définition, des cellules n'ayant pas encore acquis l'état de différenciation terminale et qui ont la capacité de se diviser tout au long de la vie de l'organisme donnant comme progéniture à la fois des cellules souches et des cellules différenciées.

Inhibition de croissance et apoptose

Dans ces tissus où l'on retrouve un renouvellement rapide des cellules, la différenciation terminale culmine dans un processus cellulaire de dégradation autocatalytique qu'on appelle la mort cellulaire programmée. Ce processus requiert la synthèse nouvelle de protéines et produit une digestion endonucléolytique caractéristique de l'ADN en plus de démontrer une condensation nucléaire et une désorganisation cytoplasmique. Communément appelée apoptose, la mort cellulaire programmée peut être vue comme un type de régulation négatif de la croissance. En effet, ce processus permet l'équilibre des tissus dans leur croissance en limitant la prolifération de certaines cellules pour y maintenir toute l'intégrité. Ce processus complexe entre dans la régulation de la survie cellulaire et est primordial pour le contrôle de la prolifération cellulaire. Il devient également très important dans le changement et le renouvellement des populations cellulaires de l'organisme. Toutes les recherches nous conduisent à l'évidence que la régulation du contrôle de la prolifération des cellules ainsi que celui de la survie cellulaire permettent le maintien du nombre de cellules et l'homéostasie. C'est l'équilibre complexe et dynamique entre des éléments qui, par des circuits positifs et négatifs, gouvernent consciencieusement la balance entre les deux. Chacun d'eux dépend de signaux spécifiques qui agissent en accord seulement lorsque les conditions sont requises. Le défi est de connaître les signaux qui régulent la survie et la prolifération de chaque type cellulaire afin de déterminer comment leurs niveaux sont contrôlés et comprendre comment les cellules intègrent ces différents stimuli extracellulaires.

Les signaux pouvant induire l'inhibition de croissance et la mort cellulaire sont nombreux. Les plus connus sont probablement les cytokines inhibant la croissance. De bons exemples de ces cytokines sont les « transforming growth factor- β » (TGF- β), une famille de protéines hautement reliées et importantes pour le contrôle de la croissance, le développement et la différenciation (Attisano *et al.*, 1994). Elles sont de grands inhibiteurs de la prolifération de plusieurs cellules épithéliales, endothéliales et hématopoïétiques, et dans plusieurs de ces types cellulaires l'arrêt de croissance est souvent accompagné par l'apoptose (Oberhammer *et al.*, 1992). Plusieurs autres stimuli extracellulaires incluant le « tumor necrosis factor » (TNF), les TGF- β , les récepteurs médiant l'activation des cellules T, les irradiations, les stress environnementaux et les cytokines inflammatoires peuvent également converger vers des voies intracellulaires induisant l'arrêt de croissance et l'apoptose des cellules (Fisher, 1994).

Dans le contexte d'un organisme multicellulaire, la décision d'aller vers l'arrêt de croissance vient de plusieurs niveaux. Un de ceux-là se traduit par le contrôle de la prolifération cellulaire exercé sur le cycle cellulaire. Il devient de plus en plus évident que la progression dans le cycle cellulaire, chez les cellules en division, est gouvernée par une famille de protéines kinases (PKs) connue comme étant les « cyclin-dependant kinases » (CDKs) et par leurs sous-unités régulatrices, les cyclines (Sherr, 1994). L'activation et l'expression de ces protéines devient l'élément clé du contrôle. Plusieurs restrictions et subtilités viennent définir et compléter le tableau de contrôle s'effectuant au niveau du cycle cellulaire. Par exemple, l'hyperphosphorylation et l'inactivation des régulateurs négatifs du cycle cellulaire comme la protéine du rétinoblastome (pRb) et les gènes ayant une parenté affiliée (i.e. p107, p130) permettent aux CDKs d'exercer un effet positif sur la croissance. D'autres classes de protéines sont également impliquées dans le contrôle négatif de la croissance. De ce groupe, p21^{waf1/CIP1} est impliquée dans l'arrêt de croissance en G1 obtenu par l'intermédiaire de p53 (El-Deiry, 1993).

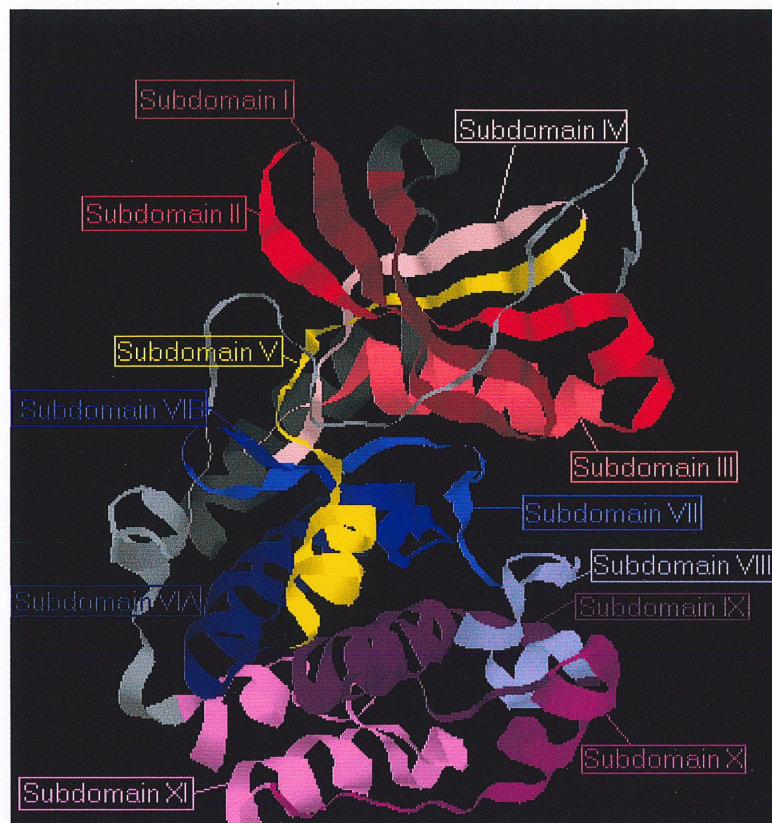
La phase G1 du cycle cellulaire est un moment critique durant lequel la cellule répond à des signaux internes et externes, ce qui influence la décision de progresser en phase S ou encore de rester en G1. Les conséquences de cette décision sont profondes et opposées : la réplication *versus* l'arrêt de croissance. Dans le contexte d'un organisme complexe, la décision d'aller vers l'arrêt de croissance peut résulter en plusieurs conditions différentes. Elles incluent l'entrée en G0 réversible (quiescence) ou irréversible (sénescence), la différenciation ou la mort cellulaire (Philipson et Sorrentino, 1991). On a vu que l'homéostasie englobe plusieurs mécanismes et que ces mécanismes étaient très bien régulés. On peut dire également qu'elle englobe plusieurs familles de protéines qui ont à jouer des rôles importants au niveau de cette régulation. Le spectre de fonctions des protéines ayant un rôle négatif sur la croissance, dans les voies d'arrêt de croissance et d'apoptose reste souvent à déterminer.

Les PKs sont liées étroitement aux mécanismes moléculaires impliqués dans de nombreux processus cellulaires comme le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire, le métabolisme, la survie cellulaire et l'expression génétique. Les processus dans lesquels elles sont majoritairement impliquées et qui m'intéressent tout particulièrement, sont les contrôles de la différenciation et de la prolifération cellulaire. La maîtrise de ces mécanismes cellulaires est depuis de nombreuses années accordé en partie à l'activation de certains membres de la famille des protéines kinases qui répondent à des signaux extracellulaires (Johnson et Vaillancourt, 1994).

Les protéines **kinases** (du grec *kinein* : stimuler) prennent leur nom de l'existence même de leur activité catalytique, laquelle a pour propriété d'activer d'autres protéines. Cette activation par la phosphorylation survient lors du transfert de groupements phosphates sur des résidus acides aminés particuliers. La spécificité du choix pour ces résidus mène au classement de ces protéines en trois classes principales: 1) les protéines tyrosine kinases qui ont la capacité de phosphoryler les résidus tyrosines 2) les sérine/thréonine kinases qui ajoutent des groupements phosphates à la

fois sur les sérines et les thréonines 3) finalement les kinases à double spécificité qui phosphorylent les trois groupements acides aminés mentionnés précédemment pour les deux autres classes. Cette famille de protéines, qui catalyse le transfert du γ -phosphate de l'ATP ou du GTP, est l'une des plus grandes et des plus diversifiées. En effet, les protéines de cette famille qui compte au-delà de 400 membres, possèdent une riche diversité d'activités. Elles possèdent également une grande variété de structures, d'activations et de substrats (Hanks et Hunter, 1995). Bien que très diversifiées, ces protéines sont apparentées entre elles par leur domaine kinase homologue (aussi connu sous l'appellation de domaine catalytique). Ce domaine consiste en une séquence de 250 à 300 acides aminés divisée en 12 sous-domaines conservés qui adoptent une structure similaire lors du repliement de la protéine (Hanks, 1991) (Figure 1.). Les principaux rôles qui peuvent être attribués à ce domaine catalytique sont la liaison et l'orientation à la fois de l'ATP (ou GTP) et du substrat dans des positions permettant le transfert du γ -phosphate sur les résidus accepteurs (Ser, Thr ou Tyr) du substrat (Hanks et Hunter, 1995).

En regard de la nature et des caractéristiques de leurs structures, les PKs participant à la transmission de signaux extracellulaires peuvent être considérées et classées en deux groupes distincts, soit les récepteurs cellulaires et les transducteurs cytoplasmiques. Dans un premier temps, les récepteurs sont responsables de la transmission de signaux extérieurs vers l'intérieur de la cellule. Par la suite, les transducteurs cytoplasmiques prennent la relève et transportent les signaux dans la portion interne de la cellule. Les récepteurs lient spécifiquement des molécules signalétiques extracellulaires et initient une réponse contrôlée dans la cellule cible. Les membres les plus illustres de ce groupe étant les récepteurs du EGF « epidermal growth factor », du IGF-1 « insulinlike growth factor », du FGF « fibroblast growth factor » et du PDGF « platelet-derived growth factor ». Dans la majorité des cas, les récepteurs kinases ont une spécificité d'action pour les résidus tyrosines ; la liaison du ligand au domaine extracellulaire mène à la dimérisation du récepteur et à un changement de conformation qui stimule l'activité kinase intracellulaire et intrinsèque spécifique de la tyrosine. On retrouve une exception bien connue, le récepteur du TGF- β qui démontre une activité sérine/thréonine kinase.



A

B

S/T kinases	GXGXXXV.....K.....E.....XXXXXXXXXX...XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX.....
ZPK	GSGAQGAV.....K.....X.....PNIITFKGVC...MEYCAQGQLYEVLRAGR.....
« subdomain »	I II III IV V
S/T kinases	XXXXXXXXXXXXXXXXXXH..HRDXKXXNXX...KXXDFGXXXX...XXXXXXXXXXPE
ZPK	LLVDWSMGIAGGMNYL H..HRDLKSPNML...KISDFGTSKE...SFACTVAWMAPE
« subdomain »	VIa Vlb VII VIII
S/T kinases	WXXG.....XXXXXXXXXX.....R
ZPK	WSMFG.....NSLHLPVPSS.....R
« subdomain »	IX X XI

Figure 1. Représentation de la structure et du repliement d'un domaine kinase. A- Structure 3D représentant les sous-domaines kinases (« subdomain ») dans leurs repliements. B- Alignement des éléments conservés pour les sérine/thréonine kinases (S/T kinases) et pour ZPK. Les éléments conservés chez ZPK sont en gras, les « subdomain » kinases sont représentés en chiffres romains et le code des acides aminés à une lettre a été utilisé (X représentant n'importe quel acide aminé) (Tableau 1.). La partie du sous-domaine VIII en gras/italique représente le domaine potentiel d'activation de ZPK.

Tableau 1 Le code génétique : les acides aminés et leurs symboles.

Symbole à une lettre	Abréviation	Nom	Codons
A	Ala	Alanine	GCA GCC GCG GCU
C	cys	Cystéine	UGC UGU
D	Asp	Acide Aspartique	GAC GAU
E	Glu	Acide Glutamique	GAA GAG
F	Phe	Phénylalanine	UUC UUU
G	Gly	Glycine	GGA GGC GGG GGU
H	His	Histidine	CAC CAU
I	Ile	Isoleucine	AUA AUC AUU
K	Lys	Lysine	AAA AAG
L	Leu	Leucine	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
M	Met	Méthionine	AUG
N	Asn	Asparagine	AAC AAU
P	Pro	Proline	CCA CCC CCG CCU
Q	Gln	Glutamine	CAA CAG
R	Arg	Arginine	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
S	Ser	Sérine	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
T	Thr	Thréonine	ACA ACC ACG ACU
V	Val	Valine	GUA GUC GUG GUU
W	Trp	Tryptophane	UGG
Y	Tyr	Tyrosine	UAC UAU
X		Variable	
	Stop	N/A	UAA UAG UGA

L'autophosphorylation du récepteur sur ces résidus tyrosines est importante. Suite à cette phosphorylation, des changements de propriétés du domaine cytoplasmique surviennent et enclenchent le processus qui permet l'activation et la liaison des protéines cytoplasmiques pour ainsi induire la signalisation. En plus de l'autophosphorylation, le récepteur a également la capacité de phosphoryler d'autres protéines cibles dans le cytoplasme activant ainsi (ou inactivant) des voies de transduction qui ont des effets différents sur la cellule. La phosphorylation de ces protéines cibles est la voie majeure pour faire passer un signal le long d'une cascade, mais ce n'est pas la seule manière d'y parvenir. En effet, quelques protéines liant les récepteurs phosphorylés peuvent être activées sans avoir de groupements phosphates transférés sur leur structure (Lewin, 1994). On visualise avec ces différentes subtilités, le processus initié par un récepteur kinase permettant ainsi de constituer une cascade de signaux de transduction. La suite du processus englobe plusieurs acteurs distincts qui commencent à être de mieux en mieux définis et délimités.

Avec le développement de la biologie cellulaire et moléculaire, plusieurs protéines impliquées dans les réseaux de signalisation ont été clonées, caractérisées et associées à de nombreux processus cellulaires. Cela nous a permis de découvrir différents arrangements et interactions entre ces protéines qui ont permis de visualiser l'ensemble de la signalisation. On commence, par ce fait, à comprendre et à démontrer que l'intégration des signaux vient des nombreux motifs et domaines se retrouvant sur les protéines de transduction. La présence de ces domaines permet de réguler la spécificité de l'organisation des cascades et des signaux qui y sont véhiculés (Johnson *et al.*, 1996).

L'activation du récepteur s'ouvre sur le monde de la signalisation intracellulaire où se côtoient non seulement des PKs intracellulaires, mais également de nombreux autres acteurs dont les petites GTPases, des adaptateurs cytoplasmiques, les protéines G et des seconds messagers lipidiques. Ces transducteurs cytoplasmiques de premier plan forment un réseau qui s'érige

comme une toile d'araignée différemment construite selon la particularité des molécules de signalisation exprimées dans une cellule cible. Dans cet ensemble, il y a donc de nombreuses combinaisons possibles pour relayer au noyau, le message qui ira réguler l'expression génétique par l'activation de facteurs de transcription. Cette représentation caricaturale rend également justice à la présence d'une quantité indéterminée de communications (« cross-talk ») survenant parmi les voies de transduction. Dans certains cas, un même signal peut ainsi voyager simultanément par plus d'un chemin. De plus, de nombreuses voies peuvent être activées en parallèle à un même stimuli extracellulaire. Par conséquent, ces différents chemins utilisés peuvent agir soit en synergie ou par opposition fonctionnelle (antagonisme). Les liens entre les différentes voies amèneraient une balance dynamique donnant à la cellule la chance de contrôler, à plus d'un niveau, la circulation cellulaire responsable de l'intégration des processus. Ce réseau complexe de signalisation est également sujet à des variations au niveau de l'intensité et de la durabilité de l'activation. Par exemple, si on prend le modèle des PKs, celles-ci sont soumises à une régulation stricte et importante, issue de plusieurs mécanismes qui se combinent pour maintenir la spécificité de la signalisation, la durée de la stimulation et l'intensité de l'activation. L'un de ces rôles de régulation est attribué aux protéines phosphatases, qui déphosphorylent et inactivent les kinases (Waskiewicz et Cooper, 1995).

La participation importante des PKs dans les cascades de signaux est un fait saillant de la signalisation cellulaire. La transduction de signaux est un processus précis qui régule l'envoi et l'amplification de signaux vers des cibles précises. Ce sont les transducteurs cytoplasmiques qui sont responsables de la transmission du message vers le noyau où s'effectue l'expression de gènes spécifiques. Ces derniers modifient et modulent, par la suite, le comportement cellulaire. Les protéines qui transportent ces signaux, même si elles catalysent souvent des événements comme la phosphorylation, affectent généralement un certain nombre précis de cibles moléculaires et montrent souvent une séparation entre leur fonction catalytique et leurs régions extra-catalytiques. Ces dernières régions permettent souvent de cibler le substrat au centre catalytique, de lier les transducteurs cytoplasmiques à des partenaires ou encore de localiser des

complexes protéiques dans des régions cellulaires précises. Ils viennent en quelque sorte réguler l'activité des protéines qui les possèdent.

Ces régions extra-catalytiques sont de plusieurs types mais peuvent être majoritairement caractérisées comme des domaines de liaison. Ceux-ci représentent souvent des modules distincts, construits pour reconnaître spécifiquement une structure particulière amenant ainsi un contrôle de spécificité pour la signalisation cellulaire. Ils modulent l'interaction de protéines et par conséquent déterminent le cœur même des voies de transduction (Cohen *et al.*, 1995). Les interactions protéiques sont étudiées depuis longtemps, mais la réalisation de l'importance des domaines de liaison dans l'activité des PKs a émergé avec la reconnaissance de l'oncogène Src « Rous sarcoma virus ». Cette protéine possède non seulement un domaine tyrosine kinase mais également deux autres domaines non-catalytiques régulant son activité : les domaines SH2 et SH3 (pour « Src homology modules ») (Koch *et al.*, 1991). Les domaines SH2 reconnaissent et lient les tyrosines phosphorylées tandis que les domaines SH3 sont aptes à lier des séquences riches en proline longues de 8 à 12 acides aminés et contenant le motif PXXP (les X représentant un acide aminé particulier) (Pawson et Gish, 1993). Cette reconnaissance a donné naissance à plusieurs investigations qui ont permis de reconnaître d'autres domaines importants pour la signalisation. Elle a également pavé la voie à l'étude des interactions protéines-protéines ainsi qu'au développement de nouvelles techniques dédiées à l'étude de ces interactions.

La mise en commun des différentes notions dans le contexte du fonctionnement des réseaux de signalisation, nous permet d'assembler une autre pièce du puzzle. L'existence de tyrosines phosphorylées sur les récepteurs kinases est l'élément déclencheur, soit l'origine intracellulaire de la transduction initiée par ce type de récepteur. Le domaine intracellulaire phosphorylé sur les tyrosines peut s'associer de façon stable avec des cibles particulières et sert ainsi de relais pour le signal. La majorité des protéines ciblées par les récepteurs utilise les domaines SH2 pour s'y fixer. Ces domaines lient spécifiquement les phospho-tyrosines du récepteur, mais sont incapables de lier l'état non-phosphorylé de celui-ci. L'autophosphorylation du récepteur amène donc le recrutement et la localisation cellulaire des premières protéines impliquées dans la

transduction de signaux via leurs domaines SH2. Plusieurs de ces protéines sont des enzymes [i.e. p120Ras^{GAP}, SHP-2, phosphoinositide 3-kinase (PI3-K), Src et PLC γ] qui voient leur activité enzymatique accentuée. Les autres sont des protéines adaptateurs (GRB2, SHC, et NCK) qui lient des protéines cibles particulières et les délivrent au récepteur activé (Denhardt, 1996).

Les GTPases

Sur la route vers le noyau, dans la liaison des voies de transduction entre la membrane et les cibles nucléaires, on rencontre de nombreux membres qui appartiennent à différentes familles. L'une d'entre elles, la famille des GTPases émerge de plus en plus comme membre important dans la signalisation cellulaire. Les GTPases sont de petites protéines liant le GTP (protéines-G). Cette superfamille de protéines peut se subdiviser en plusieurs sous-familles dont deux sont impliquées dans la transduction de signaux : celles de Ras et de Rho. La première contient trois gènes similaires soit, *H-ras*, *N-ras* et *K-ras*. L'activation des membres apparentés à Ras mène, via les voies de transduction, à des événements qui régulent des processus comme la croissance cellulaire, la différenciation et le développement. Les GTPases Ras induisent la prolifération chez de nombreux types cellulaires, la différenciation chez les PC12 et les formes oncogéniques transforment plusieurs lignées cellulaires (Bokoch et Der, 1993). La sous-famille de Rho, qui inclut Rho-A, -B, -C, -G, Rac1, Cdc42 et TC10, joue un rôle dynamique dans la régulation du cytosquelette d'actine. Récemment, ces dernières ont également été impliquées dans la régulation de cascades de signaux de transduction. Ce sont spécifiquement Rac1 et Cdc42 qui ont démontré la capacité d'activation des membres de la famille des « mitogen-activated protein kinases » (MAPKs). En effet, les « c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK)/stress-activated protein kinase (SAPK) » et la voie p38 sont activées par ces GTPases suivant des stimuli extracellulaires (Coso *et al.*, 1995 ; Minden *et al.*, 1995). Les formes Rac1 et Cdc42 liées au GTP ont démontré leur capacité de liaison et d'activation sur les protéines kinases p65^{PAK}, p120^{ACK} et MLK3/SRPK/PTK1, permettant aussi d'associer cette famille de GTPases à des cascades de

transduction impliquant des kinases (Manser *et al.*, 1993 ; Teramoto *et al.*, 1996). La liaison à ces protéines est réalisée par l'entremise d'un motif particulier, un domaine d'interaction nommé CRIB « Cdc24/Rac1 Interactive Binding region ». Les candidats potentiels contenant des motifs similaires incluent certains membres de la famille des « Mixed Lineage Kinase » (MLKs) dont ZPK fait partie (Burebelo *et al.*, 1995).

Finalement, plusieurs évidences démontrent que Ras, aussi bien que les récepteurs EGF et TNF α , effectuerait une signalisation jusqu'aux JNKs en passant par les GTPases Cdc42 et Rac1. Cette situation se rapproche énormément de l'interaction classique de Ras et Raf et suggère que la famille Rho pourrait initier également une cascade de kinases. L'hypothèse d'un lien direct des petites GTPases à la voie JNK pourrait être une cible intéressante pour de futures investigations. Les JNKs contribueraient ainsi à l'effet biologique de ces GTPases sur le contrôle de la croissance et la prolifération cellulaire.

Les JNKs

La voie des JNKs/SAPKs qu'active les GTPases Cdc42/Rac1 fait partie de la grande famille des MAPKs, famille de kinases qui prend une place remarquée dans la littérature actuelle. Chez les mammifères, plusieurs gènes connus codent pour des MAPKs et se divisent en trois sous-groupes distincts : les ERKs, les JNKs/SAPKs et finalement p38 MAPK (Cano et Mahadevan, 1995). Jusqu'à maintenant, on a visualisé comment faire le lien avec la transmission de signaux entre la membrane et le noyau. Pour mieux comprendre l'arrangement de la signalisation, une mise en contexte de la propagation des ces signaux de transduction impliquant plusieurs participants, dont les protéines MAPKs, est représentée à la Figure 2-A. Ces voies englobent d'importants médiateurs de signaux de transduction qui régulent l'expression génétique. Les signaux extracellulaires transportés par ces protéines se traduisent en une variété de processus

physiologiques différents, tels que la prolifération et la différenciation cellulaire, l'inhibition de croissance et l'apoptose. Plusieurs étapes et membres de ces voies de transduction sont connus et conservés chez la levure et chez les cellules de mammifères. Les membres de ces familles sont séparés en plusieurs cascades différentes, qui régulent habituellement des processus physiologiques différents, tout en demeurant étroitement liées. Chacune de ces cascades consiste en UNE succession de plusieurs modules qui suivent la nomenclature de Seger et Krebs et nomment les différents niveaux de kinases sans regard à leurs voies: les niveaux MAPK, MAPKK et MAPKKK (le niveau MAPK étant le niveau le plus en aval comparativement à l'initiation du signal à la membrane cellulaire) (Figure 2-B.).

Pour ce qui est de la voie des JNKs, qui m'intéresse particulièrement, elle doit son identification à la démonstration de l'activité kinase qui permet la phosphorylation du facteur de transcription c-Jun, sur son domaine d'activation dans les cellules exposées aux rayonnements ultraviolets (Hibi *et al.*, 1993). Cette activité kinase spécifique a été désignée « c-Jun NH₂-terminal kinase » (JNK). Pourquoi s'intéresser à la voie des JNKs/SAPKs ? Premièrement, parce que les JNKs sont activées par deux membres de la famille des MLKs, dont ZPK lui-même (Hirai *et al.*, 1996 ; Rana *et al.*, 1996) et que les protéines de cette voie sont impliquées dans des processus pouvant se traduire par un arrêt de la croissance, par de la différenciation cellulaire et de l'apoptose.

Les JNKs/SAPKs peuvent être activées par une multitude de stimuli extracellulaires incluant de nombreux stress environnementaux. Elles tirent de ces derniers leur nom homologue de "Stress-Activated Protein Kinase" (SAPK). Pour accomplir leur activité, elles requièrent l'habilité à interagir avec le domaine d'activation de c-Jun (Kallunki *et al.*, 1994). D'autres travaux utilisant le domaine d'activation de ce facteur de transcription comme substrat ont permis de démontrer que la phosphorylation était le résultat de la présence de protéines différentes : JNK1

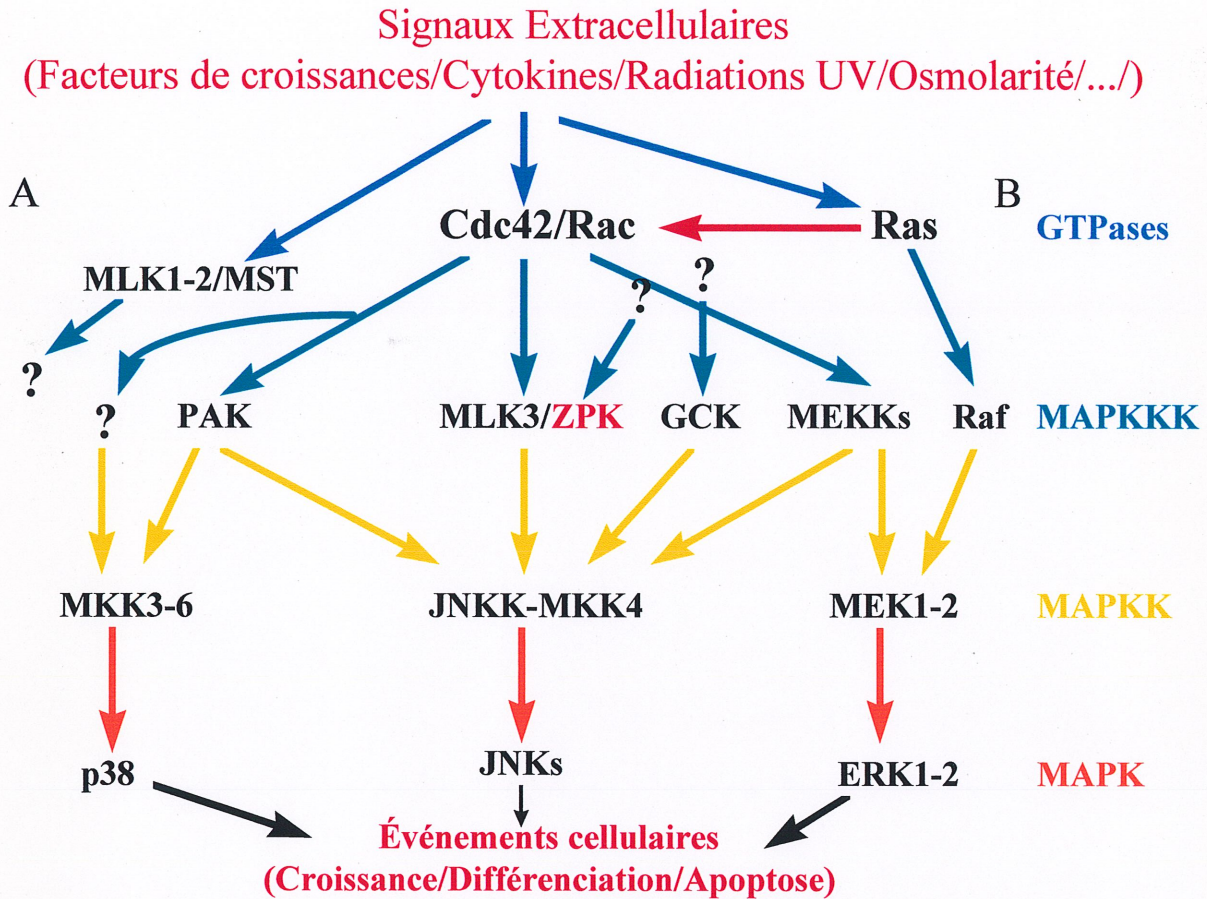


Figure 2. Voies de transduction : les MAPKs. A- Un modèle courant illustrant les branchements et les convergences des principales kinases ainsi que les GTPases contrôlant l'activité des membres de la voie des MAPKs. Les stimuli extracellulaires mènent communément à l'activation des GTPases comme Ras, Rac1, Cdc42 et résultent dans l'activation de nombreuses sérine/thréonine kinases incluant Raf, MEKK, les « mixed lineage kinases » MLK3 et ZPK/DLK/MUK. L'activation des membres de la famille des MAPKs contribue à la détermination de différents événements cellulaires. B- Modules kinases caractérisant les différents niveaux de la famille des MAPKs.

(46 KDa) et JNK2 (55 KDa) (Hibi *et al.*, 1993). Tout récemment, il a toutefois été démontré que les JNKs ne se limitaient pas seulement à ces deux formes. En effet, l'équipe de Davis a continué à les caractériser et a isolé pas moins de dix isoformes différents de JNK1, JNK2 et JNK3 (Gupta *et al.*, 1996).

Une analyse de la séquence primaire en acides aminés, déduite de JNK1 et JNK2, indiquait que celles-ci étaient distancées par rapport à leurs consœurs ERKs, les premières MAPKs découvertes. L'analyse a toutefois montré que les sites d'activation étaient conservés entre les deux sous-familles. La présence de sites d'activation est un aspect clé dans la régulation des PKs. En effet, plusieurs de ces enzymes sont phosphorylées sur un ou des résidus localisés sur un segment particulier dans le milieu du domaine kinase. Cette portion du domaine catalytique est nommé « segment d'activation » (Johnson *et al.*, 1996). Cet aspect d'importance, définit une caractéristique qui est commune aux protéines du niveau MAPK englobées par cette famille. C'est ainsi que leur activation se fait par la phosphorylation sur des sites conservés, qui sont localisés à l'intérieur d'un motif distinct. La phosphorylation s'effectue à la fois sur des résidus tyrosines et thréonines dans le segment d'activation TXY où, l'acide aminé variable (X) peut être une glycine (G) (p38), une proline (P) (JNK) ou un acide glutamique (E) (ERK). Ces sites d'activation pour les MAPKs sont localisés dans la région entre les sous-domaines kinases VII et VIII (Figure 3.).

Les protéines qui les activent, exhibent donc une activité catalytique à double spécificité qui reflète un intérêt spécial dans la régulation des signaux MAPKs. La distinction de ces motifs amène aux diverses protéines (kinases à double spécificité) capables de les phosphoryler, une spécificité relative quant à la capacité de reconnaissance de leurs substrats, amenant ainsi un niveau de régulation entre les différentes voies. Par exemple, la phosphorylation des motifs TEY se fait par des protéines incapables de phosphoryler significativement les motifs TGY et TPY. Plus concrètement, MEK1 et MEK2 (Figure 2-A.) stimulent les ERKs mais sont inaptes à

activer les JNKs ou p38 MAPK. L'ensemble des études semble s'entendre sur le fait que les ERKs sont activées significativement par des protéines différentes de celles qui activent les JNKs et p38 MAPK (Dérjard *et al.*, 1995).

La région comprise entre les sous-domaines kinases VII et VIII est reconnue pour être impliquée dans la régulation d'une multitude de PKs incluant bien sûr les MAPKs, mais aussi les MAPKKs, les MAPKKKs et plusieurs autres. Le motif de phosphorylation n'est toutefois pas toujours le même. En effet, pour la plupart des MAPKKs et des MAPKKKs le motif d'activation est SXAXS/T et implique une phosphorylation par des sérine/thréonine kinases (Figure 3.).

Cascades de transduction et spécificité

Plusieurs évidences montrent qu'il y a une spécificité entre les cascades transportant les signaux de transduction générés par les récepteurs et les PKs. Les cascades MAPKs n'échappent pas à cette règle. Les voies parallèles que représentent les ERKs, les JNKs et p38 MAPK ont chacune des activateurs qui peuvent être spécifiques ou communs et qui, lorsqu'ils exercent leur fonction de stimulation, le font de façon précise. De plus, plusieurs motifs et domaines permettraient de réguler l'organisation de ces cascades. La formation de complexes protéiques guidés par ces domaines amènerait au niveau de la signalisation des caractéristiques particulières et précises (Jonhson *et al.*, 1996).

La voie d'activation des JNKs est dépendante de la kinase JNKK1/MKK4 qui est une kinase à double spécificité régulant l'activité du niveau MAPK. JNKK semble être l'élément central par lequel passe la plupart des signaux activant la voie JNK (Figure 2.). La « Mitogen-activated/extracellular response Kinase Kinase 1 » (MEKK1) est l'une des principales PKs qui

MAPK		* *
Humain	JNK1	RTAGTSFMM TPY VVTRYRAPE
Humain	ERK1	PEHDHTGFL TEY VATRWRAP
Humain	p38	LARHTDDEM TGY VATRWRAP
		Sous-domaine VII-VIII
MAPKK		* *
Humain	JNKK1	SGQLVDS IAKTR DAGCRPYMAE
Humain	MEK1	SGQLID SMANSFV .GTRSYMSE
Humain	MKK3	SGYLVD SVAKTMD AGCKPYMAE
MAPKKK		* *
Souris	ZPK/DLK	DKSTKM SFAGT .VAW....MAE
Humain	MLK3	HKTTQM SAAGT .YAW....MAE
Souris	MEKK2	SGTGMK SVTGTPY .W....MSE
		Sous-domaine VIII

Figure 3. Comparaison des différents sites de régulation de l'activation des MAPKs. La séquence décrite représente une partie du sous-domaine kinase VIII qui est déterminée par comparaison de séquences homologues entre ces protéines. Le site d'activation pour les MAPKs est localisé dans la région entre les sous-domaines VII et VIII. Cette région, nommée boucle L₁₂, est impliquée dans la régulation de multiples kinases incluant les MAPKs, MAPK Kinases, les MAPKK Kinases (Marshall, 1994). Les sites d'activation par la phosphorylation (en gras) pour chacune des protéines sont marqués par un astérisque. À noter que la présence de **ZPK/DLK** s'est fait par comparaison de séquences homologues et que ce site est « potentiellement » impliqué dans son activation mais n'est pas démontré actuellement.

régle l'activité de JNKK. L'activation de cette protéine mène majoritairement à la phosphorylation des JNKs, mais également à celle des ERKs et de p38 (Yan *et al.*, 1994). L'une des voies menant aux JNKs passe donc par MEKK1. Cette voie MEKK1--JNKK--JNK demeure sans réponse à l'activité de c-Raf, ce qui démontre clairement la faible activation venant de p21^{ras} (Figure 2-A.). L'identité des molécules qui régulent directement MEKK1 est encore inconnue. Toutefois, les principaux activateurs de MEKK1 sont le récepteur du EGF, le second messenger que représente les céramides, Rac1 et Cdc42. Si on revient au niveau MAPKK, en plus de MEKK1 plusieurs protéines ayant la capacité d'activer JNKK sont connus (Figure 2-A.). Les MLKs (ZPK et MLK3), GCK et PAK ont déjà démontré leur potentiel à ce niveau (Fanger *et al.*, 1997). On voit très bien, par ces différents exemples, que la signalisation cellulaire est très complexe et qu'il reste beaucoup de chemins à parcourir pour comprendre le fonctionnement réel de cette mosaïque cellulaire.

Kinases et inhibition de croissance

Les kinases ont souvent été exclusivement associées à la prolifération cellulaire et à l'oncogenèse. Il est vrai que la majorité des kinases est positivement impliquée dans la prolifération cellulaire. On peut également leur attribuer des rôles dans l'arrêt de la croissance et l'apoptose. L'arrêt de la croissance est un processus actif contrôlé par l'action de nombreux types de signaux et les PKs en font parti. Les principales PKs liées au contrôle négatif de la prolifération et retenant particulièrement mon attention sont c-Abl et certains membres de la sous-famille des JNKs. Le gène de *c-Abl* code pour une protéine tyrosine kinase qui peut être localisée à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. Elle partage les caractéristiques structurales de la famille tyrosine kinase Src et inhibe la croissance cellulaire en causant un arrêt du cycle cellulaire. Sa sur-expression mène à un arrêt de croissance similaire à ce que l'on observe avec les gènes supresseurs de tumeurs comme p53 et pRb (Sawyers *et al.*, 1994). Il a été démontré qu'il existe un lien entre cette protéine tyrosine kinase et la protéine suppressive de

tumeurs p53. Le fait de trouver c-Abl s'associant à la protéine p53 supporte un rôle dans la régulation du cycle cellulaire. La phosphorylation semble être également un moyen de contrôler la fonction de cette protéine qui est phosphorylée de façon différentielle sur une série de sérines et thréonines durant la progression du cycle cellulaire (Goga *et al.*, 1995).

Les membres des JNKs démontrent des rôles reliés à l'apoptose, l'arrêt de croissance (délai dans le cycle cellulaire), la différenciation cellulaire et la réparation de l'ADN. Cette cascade de transduction est activée par les cytokines inflammatoires TNF- α et IL-6 ainsi que par une variété de stress cellulaires comme les UV, les radiations ionisantes, les chocs thermiques et les stress oxydatifs. La démonstration récente des capacités d'activation de la voie des JNKs par ZPK amène un intérêt particulier. ZPK pourrait avoir un rôle relié à certains processus reliés à l'arrêt de croissance et avoir un rôle à jouer dans l'homéostasie cellulaire. C'est dans la perspective très importante de compréhension des fonctions cellulaires dans une perspective globale, que l'étude du rôle biologique de ZPK devient importante.

ZPK

ZPK est une sérine/thréonine kinase, membre de la famille des MLKs, qui a été clonée à la fois chez l'humain (Reddy et Pleasure, 1994), chez la souris (ZPK;DLK) (Holzman *et al.*, 1994 ; Blouin *et al.*, 1996) et chez le rat (MUK) (Hirai *et al.*, 1996). Les trois espèces démontrent, avec 95% d'homologie sur l'ensemble de la séquence, une remarquable conservation dans l'évolution. Comme les autres MLKs, ZPK possède la caractéristique que son domaine catalytique est pourvu des similitudes des deux activités kinases (sérine/thréonine et tyrosine) mais avec la seule activité typique démontrée pour les sérine/thréonine kinases (Dorow *et al.*, 1993). La structure des membres de cette famille se distingue par la présence de domaines particuliers pouvant jouer des rôles interactifs dans la transduction des signaux (Figure 4.). Les

MLKs contiennent, pour la plupart, un motif SH3 à leur extrémité NH₂-terminale. Ce dernier est absent chez ZPK. Des régions riches en proline pouvant servir de cibles à la liaison de domaines SH3 se retrouvent aux extrémités de part et d'autre du domaine catalytique. De plus, elles possèdent deux motifs « Leucine/Isoleucine zipper » séparés par 25 acides aminés, situés non loin de l'extrémité COOH-terminale et suggérant la possibilité de dimérisation et/ou d'association avec d'autres protéines (Landschulz *et al.*, 1988). MLK3 et ZPK possèdent également un domaine CRIB modifié en dépit du fait que ZPK se montre incapable de lier les GTPases Cdc42 et Rac1 (Burbelo *et al.*, 1995). Le gène chez la souris a été assigné au chromosome 15 dans les environs du locus de bt/Koa (Watanabe *et al.*, 1997).

Au niveau des neurones, il est démontré que la présence de la protéine était associée, avec des caractéristiques différentes, à la fois aux fractions membranaires et cytosoliques. Dans la fraction cytosolique, ZPK existerait sous les formes phosphorylée et non phosphorylée, tandis que dans la fraction associée à la membrane, la protéine existerait seulement sous l'état phosphorylé. Une caractéristique intéressante complétant cette observation, est qu'en migration sur SDS PAGE non réducteur la fraction cytosolique migre à 130 KDa pendant que la fraction associée à la membrane migre à environ 260 KDa. Ces expériences suggèrent que ZPK pourrait former des homodimères liés de façon covalente *in vivo* (Mata *et al.*, 1996). De plus, une observation récente de notre laboratoire démontre par immunohistochimie que ZPK pourrait être associée au réseau membranaire de l'appareil de Golgi dans les cellules NIH 3T3 (Blouin *et al.*, non publiés¹). Ces dernières observations suggèrent que ZPK aurait avoir la capacité de se lier aux membranes. Les différents états de phosphorylation observés chez les neurones m'amène à suggérer un modèle hypothétique d'activation pouvant réguler les états dans lesquels ZPK pourrait se retrouver *in vivo* (Figure 5.). Des études d'expression ont démontré que ZPK était exprimée de façon préférentielle dans le cerveau chez les populations de cellules neurales. Dans ce compartiment de cellules, ZPK serait présente dans la terminaison synaptique où elle serait enrichie et associée à la fois à la membrane plasmique et au cytoplasme (Mata *et al.*, 1996). Des analyses d'hybridation *in situ* révèlent une expression différentielle du transcrit de ZPK et

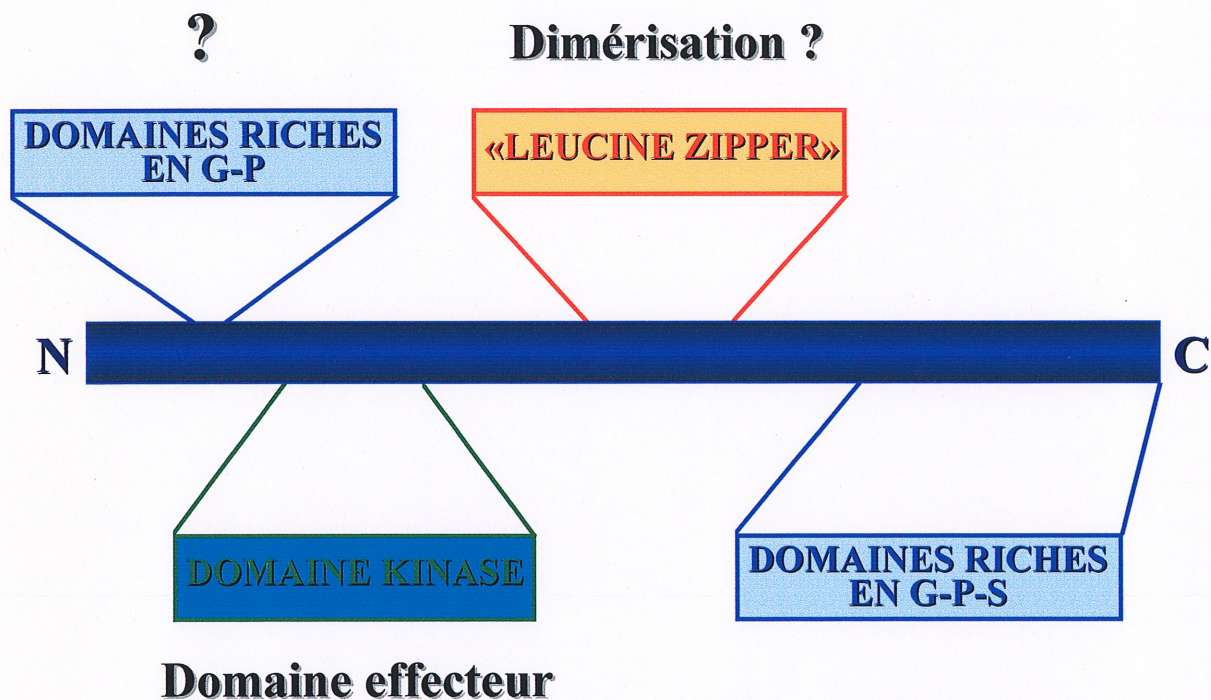


Figure 3. Structure schématique de la protéine ZPK. G-P représente un domaine riche en glycine-proline et G-P-S représente un domaine riche en glycine-proline-sérine. Le domaine « Leucine zipper » est composé de deux motifs distincts séparés par 25 acides aminés et est susceptible d'amener la dimérisation de la protéine. Le domaine kinase est responsable de l'activité effective de la protéine. Les régions riches en G-P et G-P-S n'ont pas encore de rôle connu.

des niveaux variables de celui-ci dans des populations de cellules hautement différenciées dans de nombreux organes et tissus chez la souris (Blouin *et al.*, 1996). De plus, durant l'embryogenèse chez la souris, le gène *ZPK* démontre un patron d'expression remarquable durant les différents stades de développement et ce, dans les tissus neuraux aussi bien que dans les épithéliums de nombreux organes (Nadeau *et al.*, 1997). Ces expériences ont démontré que l'ARNm de *ZPK* était principalement localisé dans des régions ayant atteint un haut niveau de différenciation terminale. Ce patron d'expression spécifique suggère un rôle dans les processus de contrôle de la croissance, de la différenciation cellulaire ainsi que dans la maintenance et le développement de cellules spécialisées.

L'exposition des cellules de la lignée de carcinome embryonnaire de souris, P19, à l'acide rétinoïque induit la différenciation de celles-ci en neurone. Cette induction est accompagnée d'une augmentation notable de l'expression de *ZPK*. Ce résultat réitère également l'idée d'implication de *ZPK* dans la différenciation et le contrôle de la prolifération cellulaire (Daigle *et al.*, non publié¹).

Des études au niveau des cascades de transduction ont démontré que *ZPK* était impliqué dans la voie qui mène à l'activation de JNK1 s'observant par une l'hyperphosphorylation de c-Jun (Hirai *et al.*, 1995). Cette activation serait similaire à celle obtenue avec MEKK1, tout en ayant une sélectivité pour la voie de JNKs (MEKK1 activant également les ERKs et p38). Malgré cette démonstration, la structure de la protéine *ZPK* se distingue de celle observée pour les MAPKs. Cela confirme qu'une multitude de voies de signalisation converge vers les JNKs. Cette première publication a ouvert la porte à une seconde presque identique dans son contenu, appartenant au groupe d'Holzman (Fan *et al.*, 1996). Ils ont repris les expériences d'Hirai *et al.* en ajoutant quelques données intéressantes sur la localisation de la protéine dans la signalisation cellulaire. Ils suggèrent que *ZPK* lierait les GTPases Rac1 et/ou Cdc42 et MEKK1 à la voie partant de v-Src et se dirigeant vers les JNKs/SAPKs et p38 (Fan *et al.*, 1996). Outre la

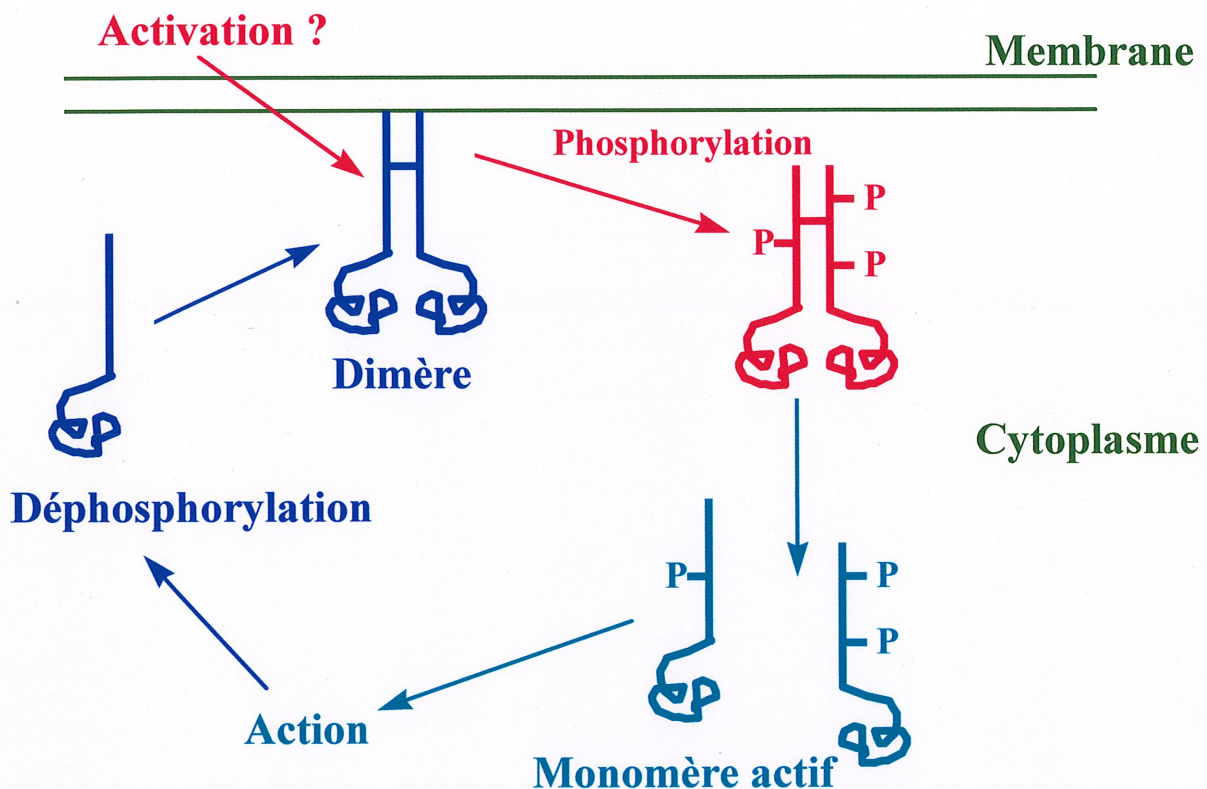


Figure 5. Modèle hypothétique d'activation de ZPK. Ce modèle d'activation est basé sur les résultats obtenus chez les neurones (Mata *et al.*, 1996) et les observations faites par immunohistochimie chez les NIH 3T3 (Blouin *et al.*, non publiés¹). On observe dans ce modèle que la forme dimérique se retrouve à la membrane dans l'état non phosphorylé. La phosphorylation amène la perte de l'état dimérique ainsi que le déplacement de la protéine vers le cytoplasme où la protéine activée par la phosphorylation pourrait exercer son action. L'arrêt de l'action s'effectuerait par la déphosphorytion potentiellement obtenue par l'entremise d'une phosphatase. La forme déphosphorylée retourne à la membrane, se dimérise et termine ainsi le cycle d'activation hypothétique.

démonstration de ces engagements dans la voie des JNKs et les études d'expression par hybridation *in situ*, la fonction de ZPK demeure obscure.

Toutefois, l'implication de ZPK à un niveau particulier dans les processus de régénération de certains tissus a pu être démontré par des études d'expression. Une régulation de l'expression de ZPK a pu être observée dans la régénération d'une fracture du fémur chez le rat, avec un maximum d'expression coïncidant avec la chondrogénèse et la formation des os (Matsui *et al.*, 1996). Les modèles d'hépatectomie et de pancréatectomie ont aussi démontré des augmentations importantes d'expression du gène suivant les blessures affligées à chacun des organes (Douziech *et al.*, non publiés¹). Des rôles dans le contrôle de la prolifération ou dans le maintien de l'état de différenciation des cellules du tissu atteint, sont également à considérer suite à ces observations.

ZPK démontre des similarités structurales avec les MLKs. Cette homologie permet de faire un rapprochement avec de récents résultats démontrant que MLK3/SPRK est également capable d'activer la voie des JNKs (Rana *et al.*, 1996). Des évidences ont été apportées sur la liaison *in vivo* de cette protéine aux GTPases Cdc42 et Rac1 (Teramoto *et al.*, 1996). La présence de MLK3/SPRK dans le même environnement rapproché de la signalisation cellulaire que ZPK permet d'émettre des hypothèses intéressantes sur la présence possible d'interactions hétérodimériques entre les membres de cette famille. Ces liaisons pourraient se faire par l'entremise de leurs motifs « Leucine/Isoleucine zipper » ou encore par l'interaction de domaine SH3 de MLK3/SPRK avec les régions riches en proline de ZPK. Ces interactions pourraient être intéressantes pour exercer différentes fonctions dans les voies de transduction.

La voie des JNKs est activée préférentiellement par les cytokines et les stress cellulaires. Elle induit, via ces stimuli, des arrêts de croissance et de l'apoptose. L'accumulation des évidences impliquant ZPK dans le contrôle de la différenciation et de la prolifération mis en commun avec

la démonstration de son implication dans la voie des JNKs, amène des données intéressantes sur la détermination de la fonction de cette kinase. C'est dans le but d'approfondir plus en détail la fonction de ZPK dans le contrôle de la croissance cellulaire, que j'ai examiné l'effet de la sur-expression du gène sur les cellules NIH 3T3.

Projet de maîtrise

Le contrôle négatif de la croissance, incluant l'arrêt de croissance et la mort cellulaire programmée, peut être étudié pour comprendre comment l'homéostasie cellulaire est maintenue et comment les altérations survenant dans l'équation du maintien de l'homéostasie peuvent contribuer éventuellement à la transformation cellulaire. Les cellules des organismes multicellulaires ne sont pas parfaitement accessibles pour des observations détaillées *in situ* de phénomènes liés à la croissance et à la différenciation cellulaire. C'est pour cette raison que la majorité des études touchant ces processus se font *in vitro* par l'entremise de modèles cellulaires en culture de cellules et tissus.

Afin d'approfondir la fonction réelle de ZPK sur la croissance cellulaire, j'ai utilisé la culture de cellules ainsi que des études de sur-expression du gène *ZPK* dans la lignée fibroblastique de souris NIH 3T3. L'utilisation d'une combinaison entre la biologie moléculaire et cellulaire a permis d'investiguer les effets causés par l'expression de *ZPK* sur les propriétés de croissance des cellules. Des vecteurs arborant l'ADNc de *ZPK* ont été utilisés pour mettre en évidence l'effet exercé par l'expression. Deux systèmes d'expression différents permettant la sur-expression ont été utilisés : 1) un système d'expression exerçant une action transcriptionnelle forte et soutenue (i.e. une expression constitutive) 2) un autre permettant une expression régulée (i.e. une expression induite). Le contrôle inductible de ce dernier, par un glucocorticoïde, permet d'obtenir l'expression dans des conditions précises durant l'expérimentation.

L'expression stable de ZPK, exercée de façon constitutive, mène à une réduction dramatique de la capacité de croissance des cellules mesurée par essai de formation de colonies. Cette expression se traduisant par une incapacité d'obtenir des clones stables exprimant ZPK. Ceci nous permettait de relier les observations faites dans les expériences d'hybridation *in situ* à un rôle potentiel dans les mécanismes de contrôle de la prolifération cellulaire. Par opposition, la sur-expression de l'ADNc de ZPK contenant une mutation du site de fixation de l'ATP n'affecte en rien l'expansion des cellules transfectées. Ce dernier résultat vient en quelque sorte confirmer que l'effet observé chez les fibroblastes 3T3 est issu non pas d'un effet toxique du produit de l'expression (ARNm ou protéines) mais véritablement de l'activité kinase intrinsèque de ZPK. Le type de mutation effectué est reconnu pour permettre l'abolition de l'activité catalytique de ce genre de protéine (Hanks, 1991). Par la suite, l'utilisation d'un vecteur inducible a permis de contrôler l'expression de ZPK et ainsi démontrer par des études de croissance et de synthèses d'ADN, que ZPK avait réellement un effet négatif sur la croissance des NIH 3T3.

L'absence d'anticorps dirigé contre ZPK ne permettait pas, lors de mes travaux, de vérifier la présence de la protéine. Je me suis donc tourné vers une alternative artificielle. C'est-à-dire l'utilisation d'une construction contenant l'épitope HA couplé à ZPK, qui permettait de détecter indirectement par Western et par immunohistochimie, l'expression de la protéine. Ce dernier aspect réalisé en parallèle, offre un outil moléculaire d'une grande utilité pour de futures investigations.

Les résultats que j'ai obtenus, durant ma maîtrise, viennent suggérer que ZPK peut agir comme régulateur de la croissance cellulaire et que cette fonction serait médiée en partie par l'activité kinase intrinsèque à la protéine (Bergeron *et al.*, 1997) (Annexe 1.). Mis en commun avec les résultats ultérieurs, cette régulation sur la croissance permet de croire que la protéine ZPK contribuerait aux processus de différenciation en exerçant un arrêt de croissance. Un contrôle sur la croissance qui pourrait se traduire, soit par l'entrée en différenciation, soit en permettant aux

cellules de conserver leur état de différenciation terminale. Les études ont aussi permis d'obtenir un système de détection de la protéine par le couplage au déterminant antigénique HA. L'ensemble de ces travaux permet de franchir une nouvelle étape dans la compréhension du rôle de ZPK et de l'implication des PKs dans le contrôle de la croissance et de la différenciation cellulaire. Tout ceci devient particulièrement intéressant puisque plusieurs altérations, dans l'activité de ces protéines, mènent à l'apparition de cancers et de nombreux autres désordres chez l'humain.

CHAPITRE 1

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1 Techniques de l'ADN recombinant

1.1.1 Souches de cellules

Lors des différentes manipulations de l'ADN, les souches bactériennes *Escherichia coli* DH5 α (GIBCO BRL, États-Unis) et TOP10 F' (Invitrogen, États-Unis) ont été utilisées selon la disponibilité.

Génotype :

DH5 α : F⁻, ϕ 80d*lacZ*- Δ -M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_r⁺) *supE54 λ thi-1 gyrA96 relA1*.

TOP10 F': F'*{lacIq, Tn10(TetR)}* *mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) phi-80 lacZ- Δ -M15 Δ -lacX74 deoR recA1 ara Δ 139 Δ -(ara-leu)7679 galU galK rpsL(StrR) endA1 nupG*.

Les DH5 α TM et les TOP10 F' sont des souches recombinantes négatives désignées pour la réplication stable de plasmides à grand nombre de copies. Le génotype de ces deux souches

permet le criblage de vecteurs recombinants par la complémentation de la β -galactosidase qui fait référence au système de sélection de colonies bleues/blanches. De plus, ces souches sont *recA1*, ce qui augmente la stabilité des inserts et *endA1* qui augmente la qualité des plasmides d'ADN purifiés.

1.1.2 Croissance des cultures bactériennes

En milieu liquide : les cellules ont été cultivées, de façon générale, dans le milieu *Luria-Bertani* (LB) (10g/L bacto-tryptone, 5g/L bacto-yeast extract et 10g/L de NaCl (pH 7,0)) auquel j'ai ajouté l'antibiotique (ampicilline 100 μ g/ml) durant les périodes de sélections des différents plasmides. La croissance s'effectuait toujours à 37°C avec une agitation de 250 RPM.

En milieu solide : l'ajout de 12,5 g/L d'agar équivalent à 1,25% au milieu LB permettait la culture en milieu solide à 37°C. Les pétris étaient incubés de façon inversée.

1.1.3 Cellules compétentes et transformation

Les cellules compétentes ont été préparées par la méthode classique du chlorure de calcium (Maniatis *et al.*, 1982). Les cellules compétentes obtenues par cette procédure ont été conservées à -70°C jusqu'à utilisation et ce, sans détérioration majeure de l'efficacité de transformation. La procédure de transformation qui a été suivie intégralement est celle du choc thermique à 42°C (Maniatis *et al.*, 1982).

1.1.4 Manipulations de l'ADN

1.1.4.1 Digestion

Les digestions ont été effectuées avec des préparations commerciales d'enzymes de restriction (Promega, Etats-Unis ; Pharmacia Biotech, Canada ; Boehringer Mannheim, Canada), selon les recommandations proposées par les fabricants. Les tampons utilisés étaient ceux fournis par les compagnies respectives. De façon routinière, 1 à 2 unités d'enzymes par μg d'ADN ont été utilisées dans le tampon approprié et à la température recommandée pour 1 à 3 heures. Pour visualiser les conditions précises de chacune des enzymes voir Tableau 2.

Tableau 2. Enzymes utilisées, conditions de réaction et fournisseurs

Enzymes	Tampons	Températures °C	Compagnies
Bsm I	Tampon H 1X	65	Boehringer Mannheim ₁
BstX I ; Eco47 III ; Not I	Tampon D 1X	37	Promega ₂
Hinc II ; Hind III	One-Phor-All 1X	37	Pharmacia Biotech ₁
Sma I	One-Phor-All 1X	30	Pharmacia Biotech ₁
EcoR I ; Spe I ; Xho I ; Ssp I	One-Phor-All 2X	37	Pharmacia Biotech ₁

1-Canada ; 2-Etats-Unis

1.1.4.2 Ligation

Afin de joindre de façon covalente des fragments d'ADN, les procédures de ligation ont été effectuées à l'aide de la T4 DNA ligase. De l'ATP à une concentration finale de 10 mM a été

utilisée. Les conditions prescrites par le fabricant ont été respectées à la fois pour les ligations d'extrémités cohésives et/ou à bout franc.

1.1.4.3 Préparation d'ADN plasmidiques

Deux procédures différentes ont été utilisées pour préparer l'ADN plasmidique. Une première ayant servi pour la préparation de petites quantités (mini-prep) et la seconde pour la préparation de grandes quantités (maxi-prep). La procédure de mini-prep de lyse alcaline a été utilisée pour des volumes de culture de 1,5 ml afin d'obtenir de petites quantités d'ADN pour des procédures d'analyse de digestion ou de séquence (Maniatis *et al.*, 1982). La procédure de maxi-prep utilisée devait permettre d'obtenir de l'ADN plasmidique d'une très haute pureté afin d'effectuer, dans la majorité des cas, des transfections sur des cellules eucaryotes. La trousse de préparation utilisée a été la « QIAGEN^R Plasmid Maxi Kit » (QIAGEN, Etats-Unis) permettant d'obtenir la purification d'environ 500-1000 µg d'ADN à partir de 100 à 200 ml de culture en milieu LB. Lors des différentes préparations, l'ADN a été mis en solution dans de l'eau stérile.

1.1.4.4 Purification des fragments d'ADN

La purification d'ADN lors des différentes procédures de clonage a été effectuée par le protocole d'isolation de fragments d'ADN à partir d'agarose « Low-Melting Point Temperature » (LMP). J'ai utilisé préférentiellement une méthode basée sur l'utilisation du phénol : après la procédure d'électrophorèse, on découpe la bande contenant l'ADN le plus petit possible et on estime le volume selon la règle 1g d'agarose = 1ml. On double ainsi le volume avec du TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0/1mM EDTA). Par la suite, on fait fondre l'agarose à 65°C de 5-10 min., on ajoute 1 volume de phénol saturé au Tris pH 8,0 avant de mélanger par inversion. On sépare les phases

par centrifugation 3 min. à 13 000 RPM avant de réaliser une deuxième extraction. La phase aqueuse est transférée dans un tube contenant 0,1 volume de 4 M LiCl qu'on place 2 min. sur la glace avant de centrifuger comme précédemment. Finalement, on précipite avec 1 µl de glycogène « carrier » et 2,5 volumes d'éthanol à -70°C, 10 min. L'ADN est récupéré par centrifugation et le culot est lavé à l'éthanol 70% puis mis en solution dans un volume d'eau de 10-30 µl.

1.2 Mutagenèse *in vitro* dirigée par oligonucléotide

Le protocole que j'ai utilisé est une procédure adaptée utilisant la fabrication d'ADN simple brin (ADNsb) UTP⁺ pour la mutagenèse. Un variant de ZPK, contenant une mutation ponctuelle résultant de la conversion en position 185 de l'acide aminé lysine (AAG) en arginine (AGG), a été construit en utilisant l'oligonucléotide suivant : (K185R) 5'- TAGCTGTGAGGAAGGTTTCG -3' (Figure 11.). Un oligonucléotide est produit avec une extrémité 5' hydroxyle. Comme la T4 DNA ligase requiert une extrémité 5' phosphate pour effectuer la ligation de l'ADN efficacement, l'oligonucléotide utilisé pour la mutagenèse a dû être phosphorylé avant utilisation. La phosphorylation de cet oligo a été effectuée par la T4 Polynucléotides Kinase (Pharmacia Biotech, Canada) et 10 mM ATP dans le tampon « One-Phor-All » 1X pour 1 h. à 37°C. La mutagenèse a été effectuée sur une partie de l'ADNc de ZPK correspondant au fragment *Hind*III - *Eco*RI des 701 premiers nucléotides de la séquence englobant la lysine (K) 185. Ce fragment a été cloné dans le phagemide pBluescript® KS (+) (Stratagene, Etats-Unis) contenant l'origine de répllication du phage filamenteux f1 permettant de récupérer le brin sens (+) du gène *LacZ* lorsque la souche hôte contenant le phagemide est co-infectée avec un phage « helper ». À noter que l'oligonucléotide utilisé est complémentaire à la séquence de ZPK insérée et produit dans ce brin (+) de l'ADNsb récupéré suite à la co-infection. Une fois cette construction obtenue, la transformation dans la souche CJ236 compétente a été effectuée. Cette

souche de phénotype (F' *cat* (=pCJ105; M13sCmr)/*dut ung1 thi-1 relA1 spoT1 mcrA*) permet d'obtenir de l'ADNsb où il y a incorporation d'uraciles (UTP).

1.2.1 Obtention de l'ADN simple brin

On inocule 5ml de milieu LB contenant 100µg/ml d'ampicilline et 30µg/ml de chloramphénicol (stock à 30 mg/ml dans l'éthanol) (à noter que le chloramphénicol permet de conserver l'épisme F' chez CJ236) avec une colonie issue de la transformation des cellules CJ236 avec la construction d'intérêt. Une croissance est effectuée durant 16 h à 37°C avec agitation. Suite à cette croissance, on inocule 30 ml de LB à une densité optique (DO600) de 0,100 assumant qu'une DO600 de 1 = 8×10^8 ufc/ml. On infecte de cette culture avec 30 µl d'un stock 2×10^{11} du phage « helper » R408 (Promega, Etats-Unis). Ensuite, on possède à une autre croissance de 16 h. à 37°C avec agitation. Suivant celle-ci, on centrifuge à 11 000 RPM pour 5 min. et récupère le surnageant. La suite de la procédure d'isolation de l'ADNsb, à partir du surnageant contenant les phages, a été effectuée selon le protocole de la trousse « QIAprep Spin M13 » (QIAGEN, Etats-Unis) avec un volume final de 3,5 ml.

1.2.2 Mutagenèse

La réaction de mutagenèse a été effectuée avec 500 ng d'ADNsb UTP+, 100 ng d'oligonucléotides phosphorylés dans un volume de 10 µl 1X OFA. Ce mélange a été dénaturé à 90°C pour 3 min. et renaturé « annealing » de 30 min. à 20°C. Suivant cette procédure, la réaction de polymérisation s'est effectuée avec 10 unités de T4 Polymérase (Pharmacia Biotech, Canada), 0,5 mM dNTPs (Stock 25mM dNTPs)(Ultrapure dNTP set, Pharmacia Biotech, Canada), 0,5 mM ATP et 1X OFA dans un volume de 20 µl contenant les 10 µl de la réaction

d'appariement et ce pour 4 h. à 20°C. La réaction a ensuite été transformée selon la procédure décrite précédemment dans les cellules compétentes DH5α F⁻. Des colonies ont été sélectionnées, et l'ADN extrait a été séquencé par la méthode de Sanger à l'aide de l'ensemble commercial de séquence T7 polymérase (Pharmacia Biotech, Canada). Un des clones positif a ensuite été sous-cloné par substitution *Xho*I-*Csp*45I (fragment de 657 pb) dans KS(+)-*ZPK* pour donner le plasmide KS(+)-*ZPK*(K/R).

1.3 Transcription/traduction *in vitro*

L'ARN traductible de *ZPK* a été généré à partir du vecteur Psp64 (Promega, États-Unis) contenant le promoteur SP6. Psp64-*ZPK* (Figure 6-A.) contient le fragment de l'ADNc de *ZPK* *Hind* III-*Sma* I de 3437 nucléotides cloné *Hind* III-(*Sma* I-*Hinc* II). Ce fragment inclut le cadre de lecture ouvert complet de 888 acides aminés. Le vecteur a été mis linéaire soit avec l'enzyme *Sma* I (3437 pb) ou avec l'enzyme *Ssp* I interne à *ZPK* et donnant naissance à un transcrit de 2724 nucléotides (Figure 6-B.). 1 µg d'ADN linéaire a été transcrit par 50 U d'ARN Polymérase SP6 (Promega, États-Unis) dans un volume de 50 µl, en présence de 0,5 mM rNTPs, 35 U de Rnguard pour 2 h. à 37°C. Les réactions de traduction ont été réalisées à l'aide de lysats de réticulocytes de lapin (Amersham, Canada) selon les recommandations du manufacturier, en utilisant une concentration finale d'ARN de 40 µg/ml. L'ARN contrôle (ARN B) était long de 2800 nucléotides (741 acides aminés) générant une protéine (protéase) de 84 KDa capable de s'autodigérer en 6 peptides différents (84 ; 76 ; 57 ; 32,7 ; 23 ; et 9,1 KDa).

1.4 Vecteurs d'expression eucaryotes

LXSN-ZPK :

Le fragment pleine longueur *Xho* I-*Not* I de l'ADNc de *ZPK* (3403 pb) a été cloné sous le contrôle de transcription du promoteur constitutif du « Moloney murine leukemia virus long terminal repeat » décrit pour le vecteur rétroviral LXSN (Miller et Rosman, 1989). Cette construction a été désignée LXSN-ZPK. Ce vecteur contient un gène de résistance à la néomycine (neo) régi par le promoteur du SV40 (Figure 9-A.).

LXSN-ZPK(K/R) :

Ce vecteur (Figure 11.) a été obtenu par substitution du fragment de 3403 pb *Xho*I-*Not*I de KS(+)-ZPK(K/R) dans le vecteur LXSN. KS(+)-ZPK(K/R) est issu du clonage par substitution *Xho* I-*Csp*45 I (fragment de 657 pb), du fragment utilisé pour la mutagénèse, dans KS(+)-ZPK (voir section 1.2).

pGRE5.2-ZPK :

Une troisième construction contenant cette fois l'ADNc complet de *ZPK* cloné *Hind*III-*Sma*I (3437 pb) a été placé sous le contrôle du promoteur inductible par la dexaméthasone composé de 5 « high affinity glucocorticoid response elements » (nommé GRE5) décrit pour le vecteur pGRE5.2 (Mader et White, 1993) (Figure 13-A.). Ce vecteur ne contient aucun gène de résistance à aucun antibiotique permettant la sélection chez les cellules eucaryotes.

KS(+)-ZPK-HA et pCDNA3-ZPK-HA :

Le produit de PCR amplifié de 1057 pb a été digéré *Spe* I-*Bst*X I afin de générer un fragment de 876 pb qui a été sous-cloné par remplacement du fragment original de 1580 pb dans la

construction pBluescript® KS(+)-ZPK (voir section 1.6.1). Ce dernier fragment contenait la région 3' non-codante de ZPK. La nouvelle construction KS(+)-ZPK-HA d'une longueur de 2723 pb est donc privée de sa partie 3' non-codante (Figure 7.). Finalement un dernier sous-clonage *Hind* III-*Not* I a été effectué dans le vecteur pCDNA3. Ce vecteur contient une origine de réplication de SV40 permettant d'obtenir une sur-expression épisomale importante dans la lignée cellulaire COS-1 exprimant l'antigène grand T du virus SV40. Ce vecteur contient les séquences du promoteur venant des gènes d'expression précoces du cytomégalo virus humain (CMV) permettant d'obtenir un haut niveau d'expression constitutive.

1.5 Lignées cellulaires et conditions de culture

Les fibroblastes de souris NIH 3T3 et les cellules épithéliales de singe COS-1 ont été de façon routinière cultivés dans le milieu « Dulbecco's modified Eagle's medium » (DMEM) complété avec 8 à 10% de « Fetal Bovine Serum » (FBS) (GIBCO BRL, États-Unis) et les antibiotiques pénicilline (10 U/ml) streptomycine (10 µg/ml) amphotéricine B (0,025 µg/ml) (GIBCO BRL, États-Unis). Les cellules sont cultivées sous une atmosphère de CO₂ à 5% dans une chambre humidifiée. Les cellules transfectées de façon stable ont été cultivées en présence de G418 à une concentration de 200µg/ml.

1.5.1 Transfection

Ces cellules ont été transfectées par la méthode de la co-précipitation au phosphate de calcium (Gorman *et al.*, 1982) à une densité de 75 000 cellules/ml dans les pétris de 100 mm. La procédure se déroule sur une période de 3 jours. Au jour 1 de la procédure, onensemence les

cellules à la densité requise. Au jour 2, 3 h. avant la mise en présence du précipité, les cellules sont changées de milieu pour du milieu frais. Le précipité est effectué avec les quantités d'ADN plasmidiques indiquées pour chacune des constructions et des expériences. Le volume d'ADN est ensuite complété à 438 µl avec de l'eau stérile. À ce volume, on ajoute 500 µl de HBS 2X (280 mM NaCl ; 10 mM KCl ; 1,5 mM Na₂HPO₄ ; 12 mM dextrose et 50 mM HEPES) et 62 µl de CaCl₂ 2M. Le précipité est formé par agitation « up and down » pour une durée de trente secondes avant d'être laissé au repos pour 20 à 30 min.. La totalité de la solution de 1 ml contenant 20 µg d'ADN est déposée dans un pétri. Au jour 3, on effectue ce que l'on appelle un choc au DMSO 25%, (le DMSO est un agent favorisant l'entrée de l'ADN dans les cellules) pour une durée de 4 min. à 37°C. Un point est à noter pour les procédures de transfection pour le plasmide pGRE-ZPK : ce vecteur ne contient aucun gène de résistance à un antibiotique. Une double transfection, dans un rapport 10 : 1 avec le plasmide LXS_N, a donc été réalisée afin d'obtenir des transfectants stables résistants au G418. Dans les premières expériences pour chacune des lignées cellulaires, des transfections transitoires avec le vecteur CMV-*LacZ* étaient effectuées pour vérifier l'efficacité de la procédure d'entrée de l'ADN. Cette technique, nommée coloration *LacZ*, consiste à démontrer la présence de la protéine β-galactosidase dans les cellules ayant reçu le plasmide lors de la transfection et exprimant maintenant la protéine.

1.5.1.1 Transfection transitoire et transfection stable

Quarante-huit heures après la choc au DMSO, on peut séparer la fin de la procédure de transfection en deux parties distinctes. Premièrement pour les expériences de transfection transitoire, les cellules sont lysées dans le tampon approprié à la suite de l'expérimentation. Deuxièmement, pour les études de transfection stable, on procède au début de la sélection à l'aide de l'antibiotique G418 (un analogue de la néomycine). La sélection était effectuée pour une période de 2 à 3 semaines avec des changements de milieu à tous les 2 ou 3 jours. À la fin de la période de sélection, les cellules étaient soit fixées et colorées avec 2% (p/v) crystal violet/1%

(p/v) ammonium oxalate/20% éthanol, soit gardées en culture dans le cas d'obtention de clones inductibles exprimant ZPK.

1.5.2 Clones inductibles : culture et expression

Les clones exprimant ZPK de façon inductible ont été obtenus par la transfection des plasmides pGRE5.2-ZPK et LXS_N dans un rapport 10 : 1. Deux à trois semaines de sélection au G418 furent nécessaires pour obtenir une sélection complète des transfectants stables. Le système de transfection utilisé n'étant pas parfait, je n'étais pas en mesure d'admettre que toutes les cellules ayant formées des colonies, contenaient bel et bien le vecteur pGRE5.2-ZPK permettant la sur-expression de ZPK. Deux options s'offraient afin d'obtenir des populations de cellules exprimant notre protéine : 1) obtenir des clones de cellules transfectées et vérifier l'expression de chacun d'eux ou encore 2) réaliser une transfection et récupérer les cellules transfectées résistantes dans un même et unique ensemble. Dans la réalisation de mes expériences, les deux options ont été réalisées et conservées. J'ai obtenu deux populations différentes. Une population englobant l'ensemble des transfectants stables d'une même transfection (population de cellules nommée NIH 3T3/pGRE5.2-ZPK) et une population issue d'un seul et unique transfectant (clone de cellules nommé NIH 3T3/Clone 3). L'induction de ces lignées est réalisée avec le glucocorticoïde qu'est la dexaméthasone (dex) à une concentration de 25 nM. Deux solutions différentes de cet agent inductible ont été utilisées lors de la période d'expérimentation, l'une soluble dans l'éthanol (dexaméthasone-21-acétate) et l'autre soluble dans l'eau (dexaméthasone) (Sigma, Canada). Des expériences ayant été effectuées avec les deux solutions n'ont démontré aucune différence significative dans les résultats. Le maintien en culture des populations inductibles s'effectuait en présence de G418 à la concentration de 200 µg/ml.

1.5.2.1 Expression (dot blot)

L'activité d'expression des différentes populations de cellules avant et après induction a été vérifiée, afin de sélectionner celles exprimant l'ARNm de *ZPK*. Une hybridation de type dot blot utilisant le fragment *Bam*HI de 1,9 Kpb (les nucléotides 128-2030) de l'ADNc de *ZPK* comme sonde a été réalisée après avoir extrait l'ARN avec du Trizol (GIBCO BRL, États-Unis). Le dot blot a été réalisé avec 5 µg d'ARN, en utilisant une membrane de nylon (Amersham, Canada). La membrane a été hybridée une seconde fois avec la sonde de l'ADNc de le β -actine de poulet (Kost *et al.*, 1983). Les hybridations ont été effectuées pendant 16 h. à 42°C dans 50% formamide, 0,5 M NaHPO₄ pH 7,2, 1 mM EDTA, 1% albumine sérique de bœuf (BSA), et 5% SDS. Suivant celle-ci, la membrane est lavée deux fois pour 15 minutes dans 2X SSC, 0,1% SDS à température de la pièce et une fois pour 30 minutes dans 0,2X SSC, 0,1% SDS à 60°C. La membrane est ensuite exposée sur film Kodak X-OMAT-AR à -70°C avec des écrans permettant d'intensifier les signaux.

1.5.2.2 Courbes de croissance

Les courbes de croissance ont été effectuées sur une période de 6 jours. Le jour 1 étant la journée où l'on effectuait la mise en culture des cellules à la densité de 5000 à 6000 cellules par puits de 35 mm de diamètre. Le jour 2 représentait le début de l'induction ainsi que celui des décomptes. Le dénombrement cellulaire s'effectuait à l'aide d'un hématimètre. Les expériences étaient effectuées en duplicata ou en triplicata. Chacune des populations cellulaires induites était comparée à son propre contrôle (population non induite) pour déterminer la croissance relative. À noter que durant ces périodes de croissance, on cultivait les cellules sans G418.

1.5.2.3 Mesure de la synthèse d'ADN

Les deux populations inductibles ainsi que les NIH 3T3 contrôles, ont été ensemencées à hautes densités (~80%). Vingt-quatre heures plus tard, elles ont été incubées dans le milieu DMEM contenant 1% FBS avec ou sans l'agent inducteur pour une période de 16 h.. Les cellules étaient finalement incubées en présence de 10 µCi/ml de [³H]thymidine pour une période d'une heure. Suite à ce marquage l'incorporation de thymidines radioactives dans l'ADN était déterminée par comptage à l'aide d'un appareil à liquide à scintillation.

1.6 Construction et expression de ZPK contenant l'épitope HA

Le déterminant antigénique (épitope) de la protéine de l'hémagglutinine de l'influenza humain (HA), dont la séquence immunogénique est « YPYDVPDYA » (représentée par le code à une lettre des acides aminés ; Tableau 1.), a été cloné sous forme d'ADN à l'extrémité COOH-terminale de la séquence de l'ADNc de ZPK. Cette séquence a été insérée par la technique de polymérisation en cascades (PCR).

1.6.1 Polymérisation en cascades (PCR)

La réaction de PCR a été réalisée sur l'ADN de la construction pBluescript® II KS (+) (Stratagene, États-Unis) contenant l'ADNc complet de ZPK. Les oligonucléotides utilisés pour cette réaction sont les suivants : l'oligonucléotide sens désigné Byk 7 5'-TCTAGACAGAGTCG

TTGCTACCTAA-3' et l'oligonucléotide anti-sens, HA ZPK 5'*GAACTAGTCCCGGGTCATG*
GAGGAAGGGAGGCAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTATGGGGGCCGCAAGGC
 ATC-3'. L'oligonucléotide HA-ZPK contient à son extrémité 5' deux sites de restriction (*Spe* I
 (*ACTAGT*) et *Sma* I (*CCCGGG*) représentés en italique) permettant de cloner facilement le
 fragment amplifié. La partie soulignée de la séquence représente les nucléotides codant pour les
 9 acides aminés du peptide HA et la région en gras indique le codon stop appartenant à *ZPK*.
 Finalement, on remarque que la séquence *HA* est bordée de chaque côté par une séquence de 15
 nucléotides codant chacun pour 5 acides aminés de la région COOH-terminale de *ZPK*. Le
 peptide HA a donc été inséré à l'intérieur même de la séquence de *ZPK* précédant les 5 derniers
 acides aminés et le codon stop. La séquence en acides aminés résultant en C-terminale est donc
 ...ALRPPYPYDVPDYAASLPP(Stop). Le programme utilisé pour la réaction de polymérisation
 en cascades est typique des programmes habituels. La procédure contenait les trois étapes
 successives de dénaturation (95°C, 30 sec.), d'appariement (60°C, 1 min.) et de synthèse (72°C, 1
 min.). Celles-ci se sont succédées pendant 25 cycles avant d'être suivi par une extension de 10
 min. à 72°C. Le produit de PCR amplifié de 1057 pb a ensuite été purifié sur gel à électrophorèse
 dans l'agarose LMP pour être digéré *Spe*I-*Bst*XI et cloné selon la procédure décrite dans la
 section 1.4 des vecteurs d'expression.

1.6.2 Western Blot

L'analyse de type Western blot est la première technique immunologique qui a été utilisée pour
 détecter la protéine portant le déterminant antigénique HA. Les extraits de protéines, de chacune
 des constructions indiquées, ont été obtenu de transfections transitoires dans les cellules COS-1.
 Les cellules ont été lysées directement dans le tampon d'échantillon (2% SDS, 100mM DTT, 60
 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% glycérol, et 0,01% bromophénol bleu) pour être ensuite déposés sur
 un gel SDS-PAGE 7%. L'électrophorèse s'est effectuée dans le tampon de migration Tris-
 Glycine-SDS en concordance avec les protocoles standards (Maniatis *et al.*, 1982). Un marqueur

de poids moléculaire coloré a été déposé sur les gels afin de suivre la migration des échantillons expérimentaux. Le transfert sur membrane polyvinyl-difluoride (PVDF) (Boehringer Mannheim, Canada) s'est effectué, selon les recommandations du manufacturier, à l'aide d'un appareil semi-sec « semi-phor » (Hoefer Scientific Instrument, Etats-Unis) pour 1 h. à 0,8 mA/cm² avec le tampon de transfert (10% méthanol, 24 mM Tris, et 194 mM glycine). La membrane a été bloquée 16 h. dans le tampon TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20 ; pH 7,5) contenant 3% de lait en poudre. Suivant le blocage, la membrane a été incubée avec l'anticorps monoclonal de souris anti-HA (clone 12CA5) à 2 µg/ml pendant 1 h.. Finalement, elle a été mise en présence d'un anticorps anti-IgG de souris conjugué à la peroxydase. La révélation a été effectuée en utilisant les réactifs de chemiluminescence (ECL) (Amersham, Canada). La détection des signaux était réalisée à l'aide d'une autoradiographie comme recommandée par le manufacturier.

1.6.3 Immunohistochimie

Les cellules COS-1 étaient cultivées sur lamelles et transfectées de façon transitoire avant d'être fixées dans le méthanol froid (-20°C) pendant 10 min. à -20°C. Les cellules ont ensuite été lavées dans le TBS (20 mM Tris-HCl (pH 7,4) 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20), puis bloquées pour 30 min. dans la même solution contenant 1% de lait en poudre et 1% BSA (TBS-B). Je procédais ensuite à une incubation d'une heure avec l'anticorps primaire anti-HA (clone 12CA5 à 1 µg/ml) dans le TBS-B à température de la pièce, suivie par trois lavages de 5 min. avec le TBS-B. Finalement, une incubation avec l'anticorps secondaire anti-IgG_{2b} de souris couplé à la phosphatase alcaline (Zimed Laboratories, Etats-Unis) a été effectuée pendant 1 h.. Deux types de lavages suivaient cette dernière incubation : 3 premiers lavages de 5 min. dans le TBS-B, puis 3 autres de 5 min. dans (100 mM Tris-HCl (pH 9,5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, et 1 mM levamisole) avant de révéler la réaction, à la noirceur, avec les réactifs NBT + X-phosphate dans le tampon utilisé pour la dernière série de lavages.

CHAPITRE 2

RÉSULTATS

2.1 Synthèse *in vitro* de ZPK

Au début du projet, nous étions dans l'incapacité de démontrer que l'ADNc de *ZPK* permettait la formation de la protéine *in vivo* lors des études d'expression, dû à l'absence d'anticorps dirigés contre la protéine. Nous nous sommes donc tournés, dans un premier temps, vers un système de transcription/traduction *in vitro* afin de déterminer si l'ADNc de *ZPK* était traductible. Pour se faire, l'ADNc de *ZPK* a été inséré dans le vecteur pSP64 contenant le promoteur de l'ARN polymérase SP6 (Figure 6-A.). Le fragment devenu linéaire par la digestion *Sma*I et ayant une longueur de 3437 nucléotides a été transcrit en ARN *in vitro*. Il a ensuite été traduit dans un système de traduction de réticulocytes de lapin (Figure 6-B., ligne A). Une seconde traduction a été effectuée avec un ARNm de 2724 nucléotides obtenu à partir d'une digestion *Ssp*I. Ce site de digestion se trouve 29 nucléotides en aval du site de terminaison TGA de *ZPK*. Cet ARNm permettait de vérifier si le codon stop ne se trouvait pas plus loin en aval de celui prédit par le cadre de lecture ouvert (ligne B). Le contrôle de traduction interne était un ARNm (ARN B) fourni dans la trousse et dont le produit est une protéine (protéase) de 84 KDa ayant la capacité de s'autodigérer en 6 fragments (ligne C). Finalement, j'ai comparé les produits obtenus pour les différentes conditions avec ceux d'une traduction réalisée sans ARNm (ligne D). Les résultats de cette expérience nous démontrent clairement que l'ADNc précédemment obtenu d'une banque d'ADNc de λ gt11 d'embryon de souris de 11,5 jours est traductible. Il donne naissance à une protéine ayant un poids moléculaire apparent de 130 kDa sur gel SDS-PAGE. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment (Holzman *et al.*, 1994).

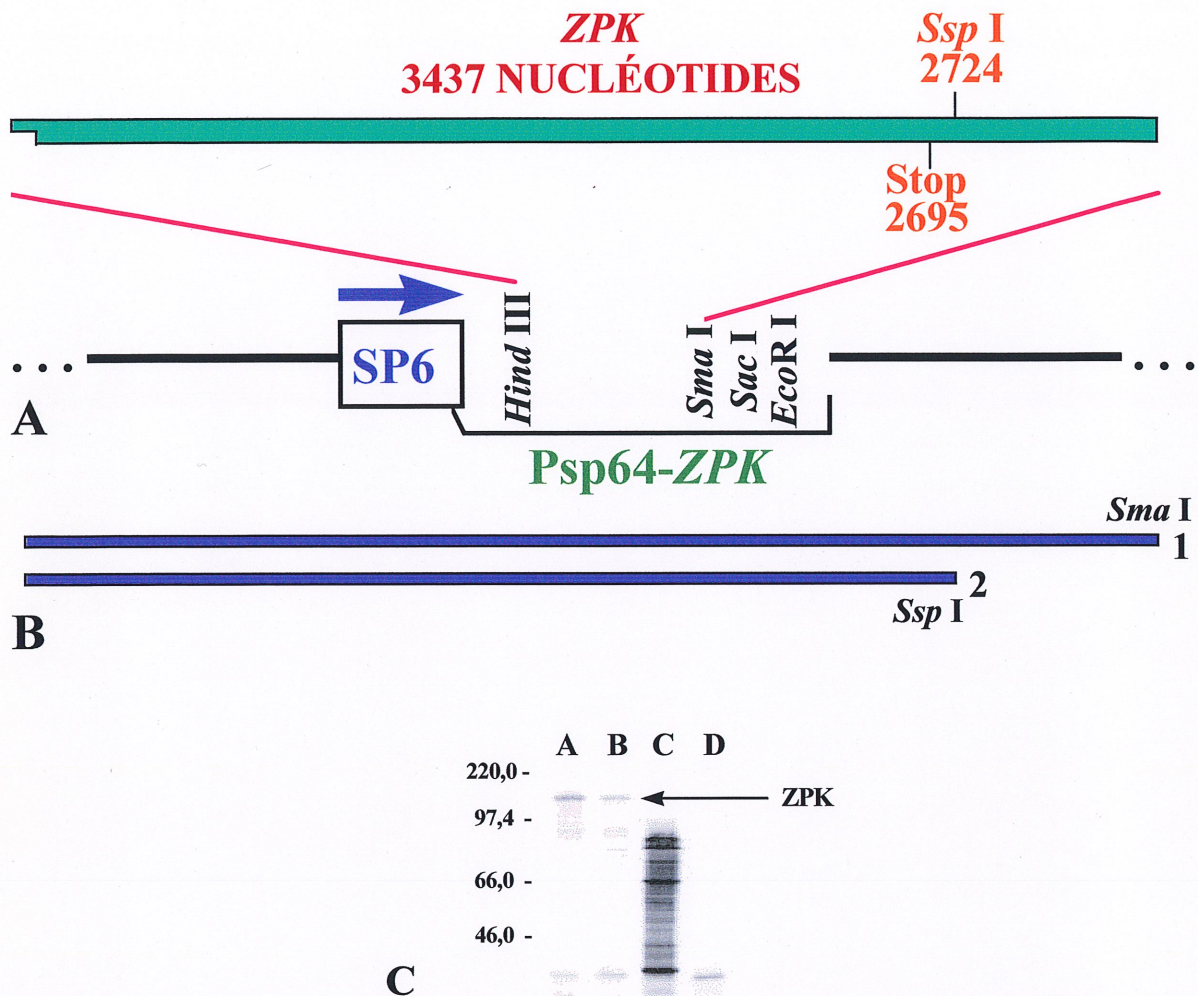


Figure 6. Analyse de ZPK par Transcription/traduction *in vitro*. A- Construction obtenue par clonage *Hind* III-*Sma* I de l'ADNc de ZPK dans le vecteur Psp64 (Promega, Etats-Unis). Ce vecteur contient le promoteur de l'ARN polymérase SP6 et permet la transcription *in vitro*. Le fragment inséré mesurait 3437 nucléotides et un site interne à l'ADNc (*Ssp* I) à 2724 nucléotides a aussi été utilisé pour générer les transcrits d'ARN. B- Les fragments 1 et 2 correspondent aux fragments utilisés pour la traduction des lignes A et B respectivement. C- Produits de traduction *in vitro* visualisés par autoradiographie après migration sur gel SDS-PAGE 7% issus du fragment 1 (ligne A), du fragment 2 (ligne B), d'un ARN contrôle (ARN B) (ligne C) ainsi qu'une traduction en absence d'ARNm (ligne D). Échelle en kDa (220 ; 97,4 ; 66 ; 46)

2.2 Construction d'une protéine ZPK contenant le déterminant antigénique HA

Une seconde approche a été utilisée pour déterminer l'expression de la protéine ZPK. Celle-ci a permis de démontrer l'expression de la protéine *in vivo* lors d'expression dans les cellules COS-1. Étant donné la non disponibilité d'anticorps anti-ZPK au moment de la réalisation de mon projet, l'élaboration d'une protéine ZPK contenant un déterminant antigénique devenait nécessaire pour visualiser la protéine par réaction immunologique indirecte. L'épitope YPYDPDVYA (code des acides aminés à une lettre, Tableau 1.) venant de la protéine de l'hémagglutinine de l'influenza humain (HA) a été incorporé par PCR à l'extrémité COOH-terminale de ZPK. Le fragment amplifié de 1057 pb a ensuite été digéré (*Spe* I-*Bst*X I) et cloné dans le vecteur KS(+)-ZPK par remplacement pour donner la nouvelle appellation de KS(+)-ZPK-HA à celui-ci (Figure 7.). La construction pCDNA3-ZPK-HA a finalement été obtenue par sous-clonage de l'insert ZPK-HA.

2.3 Expression de ZPK-HA

L'épitope HA peut être détecté par l'anticorps monoclonal (12CA5) dirigé contre ce déterminant antigénique (Boehringer Mannheim, Canada). La première réalisation importante a été de visualiser la présence de la protéine par Western blot et ainsi déterminer quelle spécificité pouvait apporter cet anticorps. Le Western blot a permis de visualiser l'expression de ZPK-HA et de ZPK(K/R)-HA dans la lignée COS-1 et ainsi démontrer que l'ADNc exprimait une protéine de poids moléculaire apparent à 130 KDa (Figure 8-A.). Les cellules transfectées de façon transitoire ont été lysées dans un tampon d'échantillon, pour ensuite être soumises à une électrophorèse sur SDS-PAGE, à une réaction de transfert sur membrane et finalement à la réaction immunologique. Les extraits cellulaires ont permis de démontrer la présence d'une protéine pour les constructions de pCDNA3-ZPK-HA et de pCDNA3-ZPK-HA(K/R) (Figure 8-

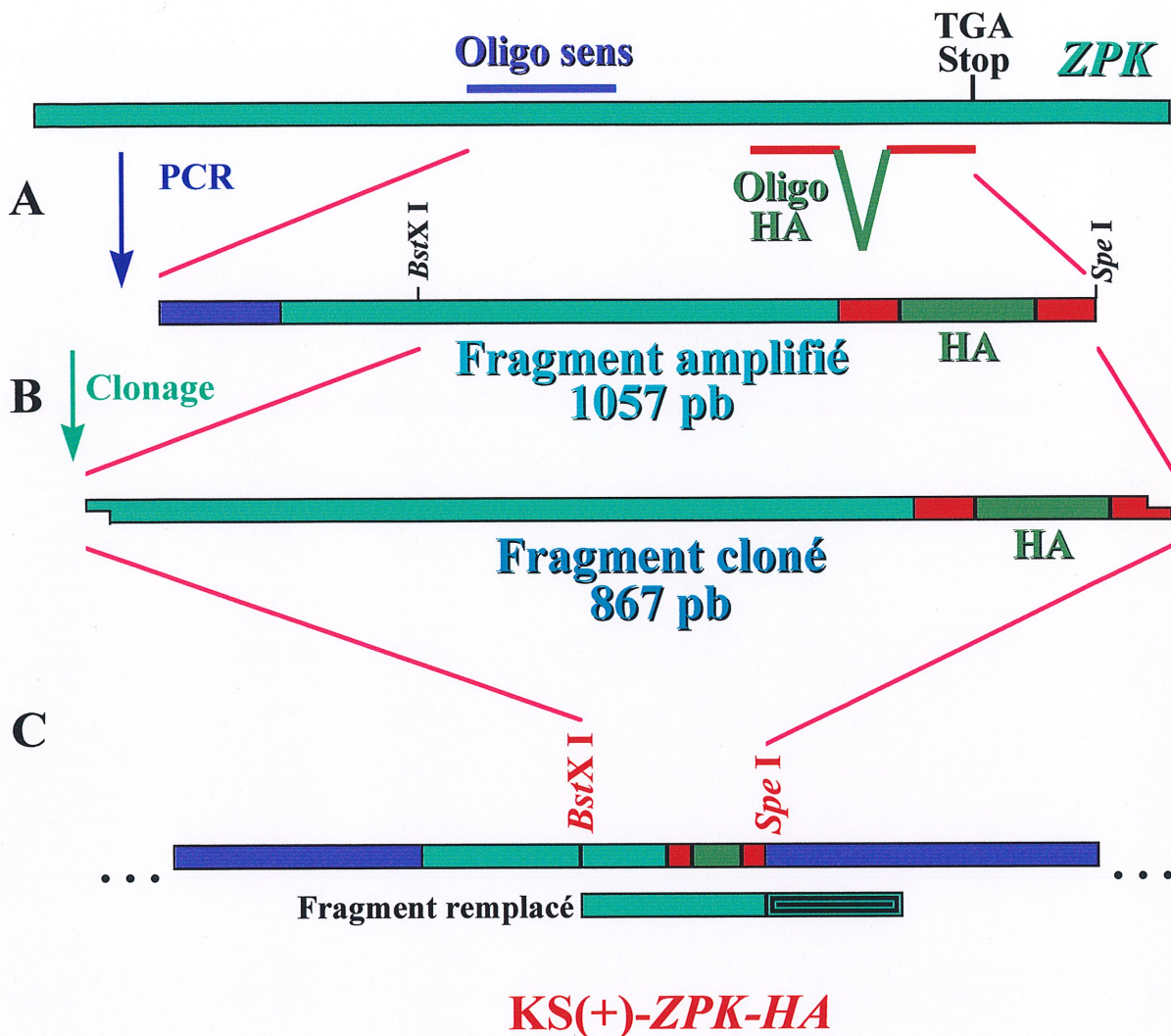


Figure 7. Construction d'une protéine ZPK contenant le déterminant antigénique HA.
 A- Représentation schématique de la réaction de polymérisation en cascade permettant d'amplifier le fragment (1057 pb) de l'ADNc de ZPK contenant le déterminant antigénique HA en COOH-terminale. B- Fragment digéré *BstX I*-*Spe I* (867 pb) permettant le clonage par remplacement dans KS(+)-ZPK. C- Obtention du plasmide KS(+)-ZPK-HA par clonage du fragment de 867 pb dans KS(+)-ZPK. Le fragment remplacé (enlevé) contient la partie 3' non-codante de ZPK () qui est maintenant absente de la nouvelle construction.

A.). Ces résultats d'expression *in vivo* viennent compléter les études de transcription/traduction réalisées précédemment. Cela permet de confirmer que la protéine ZPK est exprimée correctement dans les cellules et amène des arguments servant dans l'analyse des observations faites lors des études de croissance subséquentes. Ces observations permettent d'attribuer l'inhibition de la prolifération observée à l'expression de la protéine. J'ai démontré l'expression de ZPK normal et de sa version contenant la mutation au niveau du site catalytique (K/R). Par la réalisation d'un Western blot sur les cellules COS-1, on observe non seulement la protéine ZPK-HA, mais également la présence de réactions croisées avec les protéines issues de cette lignée de cellules de singe (Figure 8-A.)

Grâce à l'expression de l'antigène grand T du virus SV40, les cellules COS permettent la sur-expression des gènes lorsqu'elles sont transfectées par un vecteur contenant une origine de réplication de ce virus. Cette origine de réplication permet d'obtenir un grand nombre de copies de l'épisome pour ainsi obtenir une augmentation de l'expression protéique. Ce système a permis, malgré la présence d'une certaine réactivité croisée avec les protéines de la lignée cellulaire, de réaliser une expérience d'immunohistochimie permettant de localiser la protéine dans la cellule (Figure 8-B.). La sur-expression obtenue dans les cellules COS ne permet toutefois pas de localiser la distribution de la protéine dans des compartiments spécialisés. Ce genre d'expérience permet plutôt de démontrer la localisation d'une protéine dans le cytoplasme, le noyau ou les régions membranaires. Dans la réalisation de cette expérience, on remarque la présence de la protéine ZPK-HA dans le cytoplasme des cellules COS (Figure 8-B.).

2.4 ZPK inhibe la formation de colonies chez la lignée cellulaire NIH 3T3

L'expression de ZPK est regroupée dans des populations de cellules spécialisées reconnues comme ayant atteint un haut niveau de différenciation souvent associé à l'arrêt de la

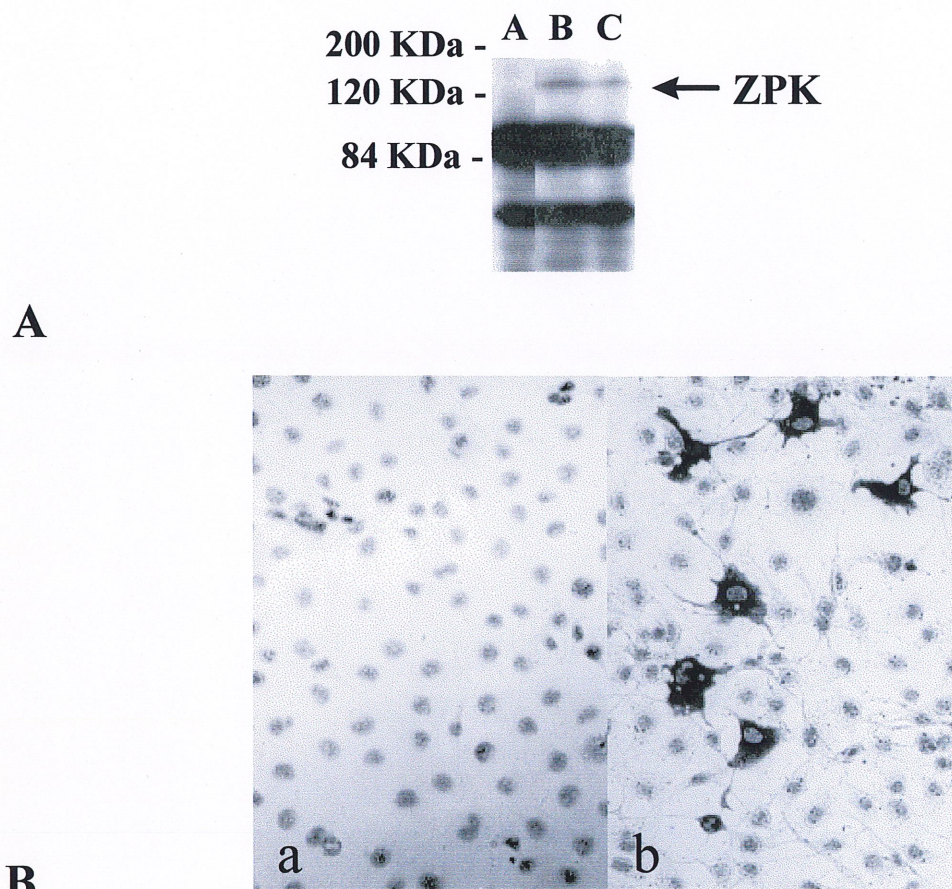
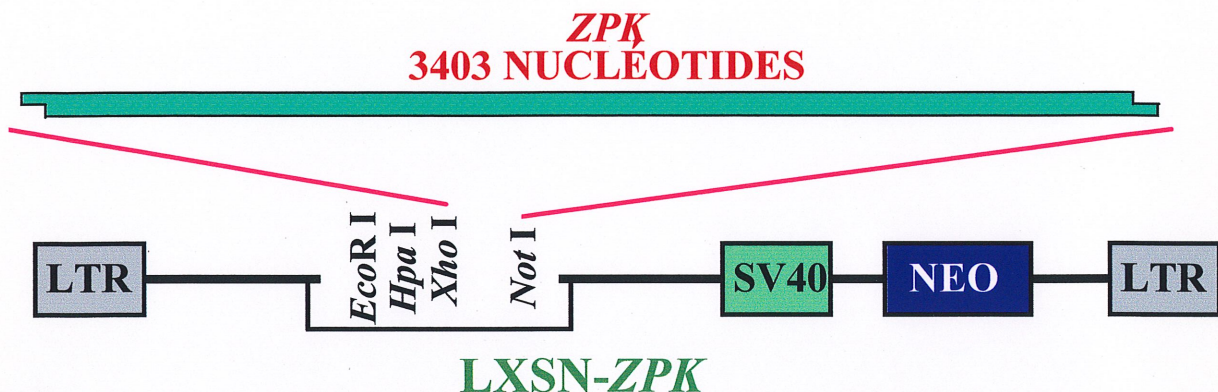


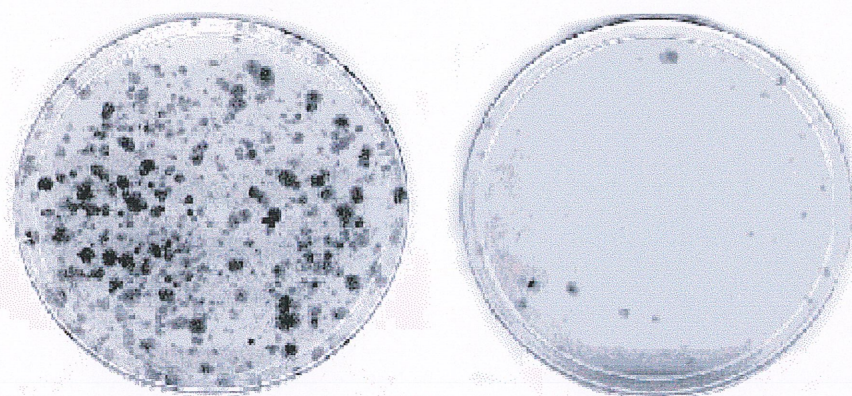
Figure 8. Observation de l'expression de ZPK-HA. A- Représentation d'un Western blot obtenu après transfection des cellules COS-1 avec les constructions pCDNA3 (contrôle) (ligne A), pCDNA3-ZPK-HA (ligne B) et pCDNA3-ZPK-HA(K/R) (ligne C). Les protéines ont été révélées par l'anticorps anti-HA (12CA5) et l'anticorps secondaire anti-souris de l'ensemble commercial ECL (Amersham, Canada). B- Réaction d'immunohistochimie réalisée sur les cellules COS-1 transfectées avec le plasmide pCDNA3 (contrôle) (a) ou pCDNA3-ZPK-HA (b). On remarque la réaction positive à la couleur noire retrouvée dans le cytoplasme de certaines cellules transfectées (b). Chez le contrôle (a), on ne retrouve pas ce marquage. Échelle en kDa (200 ; 120 ; 84)

prolifération cellulaire (Blouin *et al.*, 1996). On a voulu déterminer l'effet de l'expression de ZPK sur la croissance cellulaire des NIH 3T3. Pour ce faire, un essai qui permet de mesurer par transfection, l'efficacité des cellules à former des colonies a été utilisé. Cet essai a été utilisé précédemment pour démontrer l'effet négatif sur la croissance cellulaire de nombreux gènes (p53, Rb, p107) (Zhu *et al.*, 1993). L'expérience est basée sur le principe que les cellules transfectées, avec un vecteur exprimant une protéine empêchant la croissance cellulaire, sont incapables de former des colonies en présence de la drogue permettant la sélection des cellules transfectées.

La construction d'un vecteur d'expression rétroviral (LXSN) a préalablement été effectuée. Cette construction contient l'ADNc complet de ZPK qui nous permettait d'effectuer la sur-expression du gène dans la lignée fibroblastique de souris que représente les NIH 3T3. Cette lignée est un modèle de culture *in vitro* grandement utilisé pour des études de croissance cellulaire. Le fragment de l'ADNc complet *Xho* I-*Not* I a été inséré sous le contrôle du promoteur constitutif fort du « Moloney murine sarcoma virus long terminal repeat » (Figure 9-A.). Les différents vecteurs contenant le gène de résistance à la néomycine sont transfectés. Après trois semaines de sélection en présence de l'antibiotique G418, les pétris de cellules sont colorés et fixés au crystal violet et le nombre de colonies résistantes à la néomycine (G418) est compté. Comme montré à la Figure 9-B, le nombre de colonies transfectées avec le vecteur d'expression LXSN-ZPK est presque inexistant comparativement à celui obtenu par la transfection d'une quantité équivalente de vecteur sans insert servant de contrôle (LXSN). Ce résultat démontré avec LXSN-ZPK nous indique que la sur-expression du gène a un effet négatif sur la croissance cellulaire. L'inhibition est mesurée par le nombre réduit de colonies, qui a été observé pour de nombreuses expériences avec différentes préparations de LXSN-ZPK et de LXSN. Le nombre de colonies résistantes obtenues a toujours été très faible et même parfois inexistant. Un effet similaire a été observé avec la lignée de cellules pancréatiques transformées PANC-1 (résultats non montrés). Ces résultats suggèrent que le haut niveau d'expression de



A



B

LXSN

LXSN-ZPK

Figure 9. Inhibition de la croissance cellulaire de ZPK dans les NIH 3T3. A- Représentation schématique du vecteur LXSN-ZPK. Construction obtenue par clonage *Xho* I-*Not* I de l'ADNc de ZPK dans le vecteur LXSN. Ce vecteur contient le promoteur constitutif du « Moloney murine leukemia virus long terminal repeat ». Il a été nommé LXSN-ZPK comparativement au vecteur sans insert qui se nomme LXSN. B- Activité inhibitrice de ZPK dans les cellules NIH 3T3. Les cellules ont été transfectées avec 20 µg de l'un ou l'autre des vecteurs d'expression, cultivées dans un milieu de sélection contenant du G418 pour 3 semaines et finalement colorées au crystal violet.

ZPK mène soit à un ralentissement de la croissance, à un arrêt de celle-ci ou encore à une forme de mort cellulaire.

2.5 Dose-dépendance de l'activité inhibitrice de ZPK sur la croissance

Afin d'examiner plus en profondeur l'effet inhibiteur observé lors de la transfection de LXS_N-ZPK, des expériences de co-transfection où l'on varie la concentration de plasmides ont été effectuées. Les NIH 3T3 ont été transfectées avec différentes concentrations partagées entre les constructions LXS_N-ZPK et de LXS_N, pour atteindre dans les proportions indiquées la quantité totale de 20µg (Figure 10.). Les colonies résistantes au G418 furent comptées après 21 jours de sélection. Des résultats représentatifs de deux expériences indépendantes sont présentés sous forme de graphique (Figure 10.). L'augmentation de la concentration de LXS_N-ZPK concorde avec la chute dramatique du nombre de colonies dans la culture et inversement, la diminution de la concentration de LXS_N-ZPK permet l'obtention d'une concentration accrue de colonies. À la plus haute concentration de plasmides utilisée pour la transfection, le contrôle LXS_N donne approximativement 330 colonies par pétri de 100 mm de diamètre. Par opposition, LXS_N-ZPK donne un nombre moyen de 8 colonies résistantes. Ces résultats indiquent encore une fois que l'expression de ZPK mène à un effet négatif sur la croissance cellulaire.

2.6 Le site de fixation de l'ATP de ZPK est nécessaire à l'inhibition de la croissance

Afin d'approfondir les observations obtenues et de déterminer si l'activité sérine/thréonine kinase intrinsèque de la protéine ZPK était requise pour l'inhibition de la croissance cellulaire, la construction d'un mutant catalytique de ZPK par mutagenèse dirigée a été effectuée. La substitution d'un seul acide aminé a été effectuée afin d'obtenir un ADNc de ZPK mutant dans le

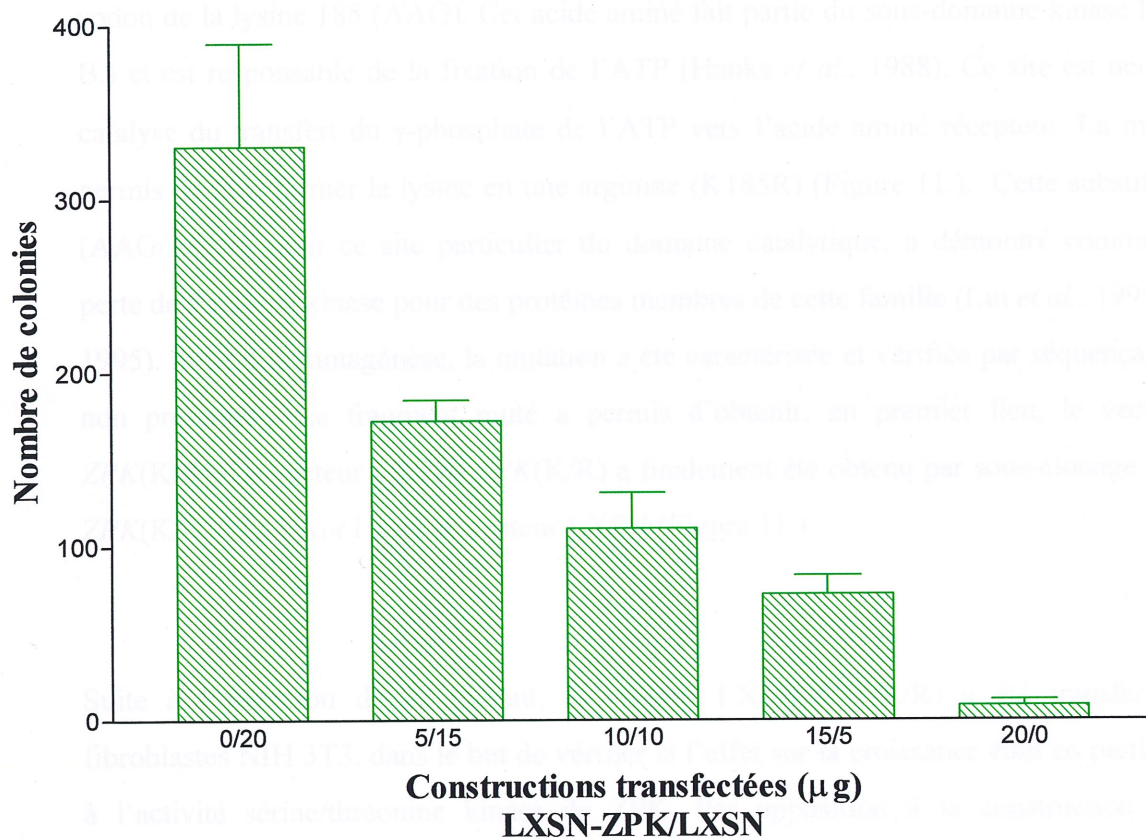


Figure 10. Effet dose-dépendante de ZPK sur la croissance cellulaire. Les cellules ont été co-transfectées avec différentes concentrations des vecteurs d'expression LXS-N et de LXS-N-ZPK. La concentration totale a été gardée constante à 20µg. Les cellules ont été cultivées pendant deux semaines dans un milieu de sélection contenant du G418 et finalement, fixées et colorées au cristal violet pour permettre le décompte du nombre de colonies résistantes. Les données représentent la moyenne \pm l'écart type de deux expériences indépendantes.

codon de la lysine 185 (AAG). Cet acide aminé fait partie du sous-domaine kinase II (Figure 1-B.) et est responsable de la fixation de l'ATP (Hanks *et al.*, 1988). Ce site est nécessaire à la catalyse du transfert du γ -phosphate de l'ATP vers l'acide aminé récepteur. La mutagenèse a permis de transformer la lysine en une arginine (K185R) (Figure 11.). Cette substitution (K/R) (AAG/AGG), pour ce site particulier du domaine catalytique, a démontré comme résultat la perte de l'activité kinase pour des protéines membres de cette famille (Lin *et al.*, 1995 ; Xu *et al.*, 1995). Suite à la mutagenèse, la mutation a été caractérisée et vérifiée par séquençage (résultats non présentés). Le fragment muté a permis d'obtenir, en premier lieu, le vecteur KS(+)-ZPK(K/R). Le vecteur LXS_N-ZPK(K/R) a finalement été obtenu par sous-clonage du fragment ZPK(K/R) *Xho* I-*Not* I dans le vecteur LXS_N (Figure 11.).

Suite à l'obtention de ce mutant, le vecteur LXS_N-ZPK(K/R) a été transfecté dans les fibroblastes NIH 3T3, dans le but de vérifier si l'effet sur la croissance était en partie attribuable à l'activité sérine/thréonine kinase de ZPK. Par opposition à la construction LXS_N-ZPK contenant l'ADNc normal de ZPK, les cellules transfectées avec le vecteur LXS_N-ZPK(K/R) ont donné lieu à un nombre de colonies comparable au vecteur sans insert LXS_N (Figure 12.). En représentant les résultats en pourcentage relatif à la construction LXS_N (100%), on retrouve pour la construction exprimant la protéine ZPK(K/R) un pourcentage correspondant équivalent (102%) et pour LXS_N-ZPK un pourcentage d'environ 4%. Ce dernier résultat concorde avec ceux obtenus précédemment dans d'autres expériences (Figure 9.). Des quantités équivalentes (20 μ g) de plasmides ont été utilisées pour les transfections. Les résultats moyens (\pm l'écart type) représentatifs de quatre expériences faites en duplicata ou en triplicata sont représentés sous forme de graphique (Figure 12.).

Cette dernière constatation suggère que l'activité enzymatique de ZPK est critique pour conférer le potentiel de la protéine à inhiber la prolifération cellulaire. Le mutant du site de fixation de l'ATP de ZPK, ZPK(K/R), n'affecte pas la croissance des fibroblastes NIH 3T3. Il démontre une

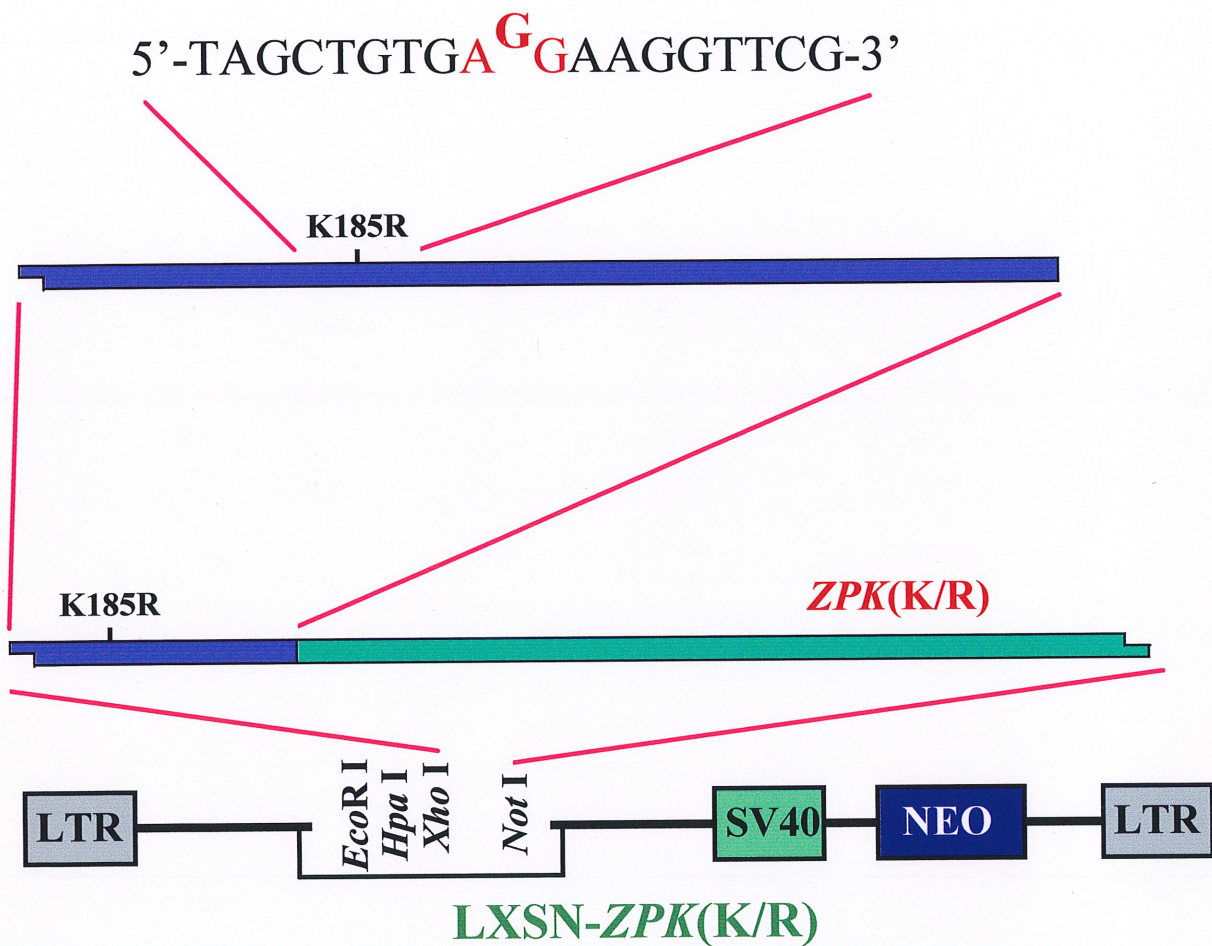


Figure 11. Mutant du site de fixation de l'ATP pour ZPK (K185R). Représentation schématique du vecteur d'expression LXS-N-ZPK(K/R) obtenu par sous-clonage d'un fragment ayant subi une mutagenèse dirigée par oligonucléotide. La mutagenèse a été obtenue avec l'oligonucléotide 5'-TAGCTGTGAGGAAGGTTTCG-3' permettant de réaliser une mutation ponctuelle dans le codon de la lysine 185 (AAG) afin de changer celle-ci en arginine (AGG). Le fragment *Xho* I-*Not* I de KS(+)-ZPK(K/R) a été sous-cloné dans le vecteur LXS-N afin d'obtenir le vecteur LXS-N-ZPK(K/R).

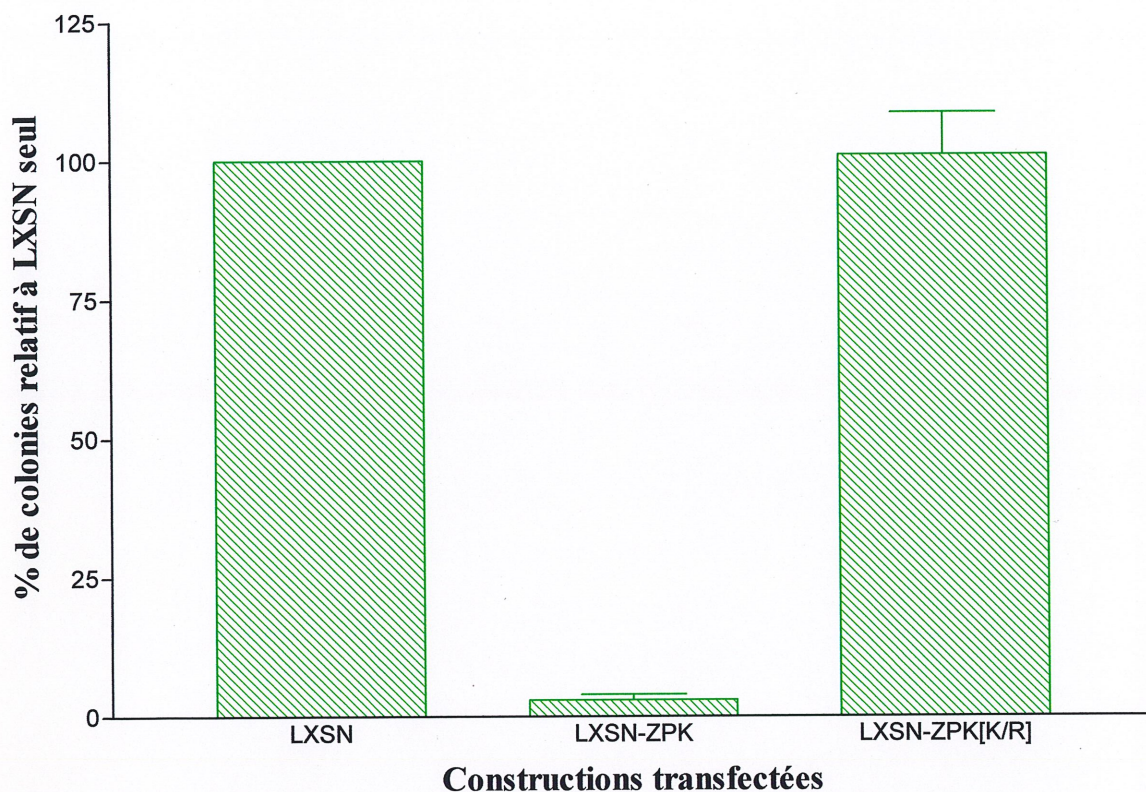


Figure 12. ZPK requiert un site de fixation de l'ATP intact pour inhiber la croissance cellulaire. Les cellules NIH 3T3 ont été transfectées avec 20 μ g du vecteur LXSXN ou avec la concentration équivalente (20 μ g) des constructions indiquées. Par la suite, les cellules ont été cultivées 3 semaines dans un milieu contenant du G418 comme agent de sélection. Les cellules ont été colorées et fixées au crystal violet afin de déterminer le nombre de colonies résistantes au G418. Les colonnes montrent l'effet relatif des différentes constructions sur la formation de colonies exprimée en pourcentage de colonies relatif à celui obtenu avec LXSXN seul (100%). Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart type de quatre différentes expériences.

croissance caractéristique équivalente à celle du vecteur LSXN qui servait de contrôle. Cette expérience permet de suggérer que l'effet observé sur la croissance cellulaire est un effet inhibiteur différent, sinon prédominant, d'un effet toxique potentiel de ZPK sur les cellules. L'activité catalytique sérine/thréonine kinase permettrait à ZPK d'exercer une inhibition de la croissance suite à la sur-expression de la protéine dans les NIH 3T3.

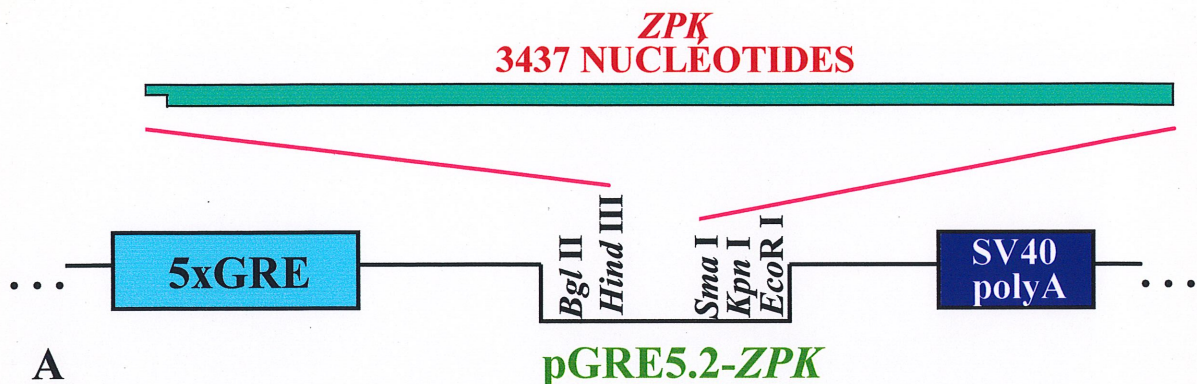
2.7 Démonstration de l'inhibition de croissance par sur-expression de ZPK induite par la dexaméthasone.

Dans le but de poursuivre la caractérisation de l'effet de ZPK sur la prolifération cellulaire, nous avons tenté de trouver un système permettant d'obtenir non seulement des cellules exprimant de façon stable la protéine, mais pouvant également induire cette expression à notre guise. Pour approfondir l'effet de ZPK sur la croissance cellulaire, j'ai utilisé un vecteur ayant un promoteur inducible. Ce vecteur permettait de contrôler plus précisément le moment et les conditions d'expression du gène. Le choix d'un vecteur s'est fait sur la base de trois critères importants. Soit d'être en mesure, dans l'état de repos, d'avoir un taux d'expression basal très faible ou même nul, de répondre par une forte expression à son agent inducteur et l'agent inducteur doit être non toxique pour les cellules et ne démontrer aucun ou peu d'effet sur la croissance.

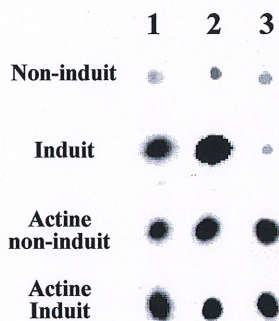
Les NIH 3T3 ont été transfectées avec un vecteur d'expression (pGRE5.2) contenant un promoteur inducible par la dexaméthasone composé de 5 « high affinity glucocorticoid response elements » (GRE5) contrôlant l'expression de ZPK (Figure 13-A.). L'ADNc de ZPK a été inséré par un sous-clonage du fragment *Hind* III-*Sma* I. Ce vecteur ne contient aucun gène de résistance contre un antibiotique permettant la sélection des cellules eucaryotes. Pour pallier à ce problème, une co-transfection du vecteur pGRE5.2-ZPK avec un deuxième vecteur (LXSN) contenant le gène de résistance à la néomycine dans un rapport 10 : 1 a été effectuée. Ceci permettait

d'espérer que les cellules transfectées avec LXS_N recevraient également pGRE5.2-ZPK. Les cellules issues de différentes expériences ont poussé pendant 21 jours dans un milieu contenant du G418 afin de sélectionner les cellules exprimant le gène de résistance à la néomycine. Le système de transfection utilisé n'étant pas parfait, et ne permettait pas d'admettre que toutes les cellules ayant formé des colonies après la sélection, contenaient le vecteur pGRE5.2-ZPK. Deux options s'offraient afin de produire des cellules exprimant ZPK : 1) obtenir des clones et vérifier le niveau d'expression pour chacun d'eux ou encore 2) réaliser une expérience de transfection et récupérer l'ensemble des cellules transfectées résistantes dans un même et unique ensemble. Des expériences ont été réalisées en utilisant les deux approches mentionnées. Les clones évitant le problème de l'hétérogénéité amenée par l'autre population (toutes les cellules issues d'un clone devant exprimer également ZPK lors de l'induction).

Le niveau d'expression vérifié par « dot blot » avec ou sans induction à la dexaméthasone, a permis de sélectionner deux populations de cellules différentes sur-exprimant ZPK (Figure 13-B.). Celle issue de l'ensemble d'une même transfection mise en commun (NIH3T3/pGRE5.2-ZPK) ainsi que celle issue d'un seul transfectant (NIH 3T3/Clone 3) ont été conservées (Figure 13-B.). Pour comparer l'augmentation d'expression de ZPK, il a fallu comparer les conditions induites et non induites entre elles. De plus, chacune des populations de cellules ont été comparée avec les cellules NIH 3T3 non transfectées. Les résultats nous démontrent que l'expression non induite obtenue pour ces deux populations est comparable à celle retrouvée pour ZPK chez les NIH 3T3 (niveau endogène). Les deux populations de cellules démontrent, après 48 h d'induction, une forte augmentation d'expression de l'ARNm de ZPK. Cette augmentation est évidemment absente chez les cellules non transfectées. Finalement, on remarque, par l'hybridation avec la β -actine, que les quantités d'ARN qui ont été déposées sur la membrane pour chacun des échantillons étaient équivalentes. Ceci permet de qualifier les niveaux d'expression obtenus après induction à des augmentations réelles de la quantité d'ARNm de ZPK (Figure 13-B.). Le choix des populations de cellules inductibles a été effectué à partir d'un échantillonnage de 12 clones différents (résultats non présentés).



A



B

Figure 13. Démonstration de l'expression inductible du vecteur pGRE5.2-ZPK.
A- Représentation schématique du vecteur d'expression pGRE5.2-ZPK. L'ADNc complet de ZPK a été cloné *Hind* III-*Sma* I (3437 pb), sous le contrôle du promoteur inductible par la dexaméthasone composé de 5 « high affinity glucocorticoid response elements » (nommé GRE5). Ce vecteur ne contient aucun gène de résistance à aucun antibiotique permettant la sélection chez les cellules eucaryotes. **B-** Niveau d'expression du vecteur pGRE5.2-ZPK, déterminé par dot blot, à partir de 5µg d'extrait d'ARN des cellules NIH 3T3 (contrôle) (ligne 3), NIH 3T3/pGRE5.2-ZPK (ligne 2) et NIH 3T3/Clone 3 (ligne 1). On retrouve les conditions induites avec 25 nM de dexaméthasone et non induites. La membrane a été hybridée avec une sonde de l'ADNc de ZPK marquée au ³²P. Comme contrôle, la membrane a été hybridée avec une sonde de β-actine.

2.7.1 Démonstration de l'arrêt de croissance des populations de NIH 3T3 inductibles

Les cellules NIH 3T3/pGRE5.2-ZPK et NIH 3T3/Clone 3 ont été utilisées pour effectuer des études sur la prolifération cellulaire. Afin de vérifier comment se comportait la croissance des cellules suivant la sur-expression de ZPK, l'induction de ZPK a été effectuée pour démontrer son effet sur le taux de croissance des NIH 3T3. Des courbes de croissance ont été effectuées sur une période de 5 jours, ce qui a permis de démontrer que l'effet inhibiteur sur la croissance arrive rapidement suivant l'induction de l'expression de ZPK (Figure 14.). Les résultats présentés sur le graphique de la Figure 14 représentent les pourcentages relatifs d'inhibition d'une population par rapport à cette même population non induite (contrôle) (*i.e.* que chacune des populations est comparée à elle-même pour déterminer l'effet de l'induction). Une population parentale de NIH 3T3 était également utilisée comme contrôle afin de démontrer que l'effet observé était vraiment attribuable à l'induction de l'expression de ZPK et non à un effet de la dexaméthasone sur la croissance. Dans les premiers 24h, on observe l'inhibition la plus marquée avec 45% de cellules en moins au niveau des populations induites. Par la suite le taux de croissance semble se stabiliser sur les trois dernières journées, pour finalement atteindre au jour 5 de l'expérience des niveaux cellulaires inférieurs de 81 à 85% pour les populations induites. On observe que le taux d'inhibition pour les deux populations de cellules adopte sensiblement la même tendance sur la période de 5 jours.

Les NIH 3T3 parentales non transfectées réagissent à l'induction par la dexaméthasone en démontrant une d'inhibition d'environ 40% sur 5 jours. Cette observation non négligeable démontre que la dexaméthasone inhibe la croissance des NIH 3T3. Une partie de l'inhibition observée est donc attribuable à l'effet de la dexaméthasone sur la croissance des NIH 3T3, mais l'inhibition combinée chez les cellules exprimant ZPK demeure plus importante avec 85% d'inhibition. Ces observations suggèrent encore une fois que l'expression ZPK amène une

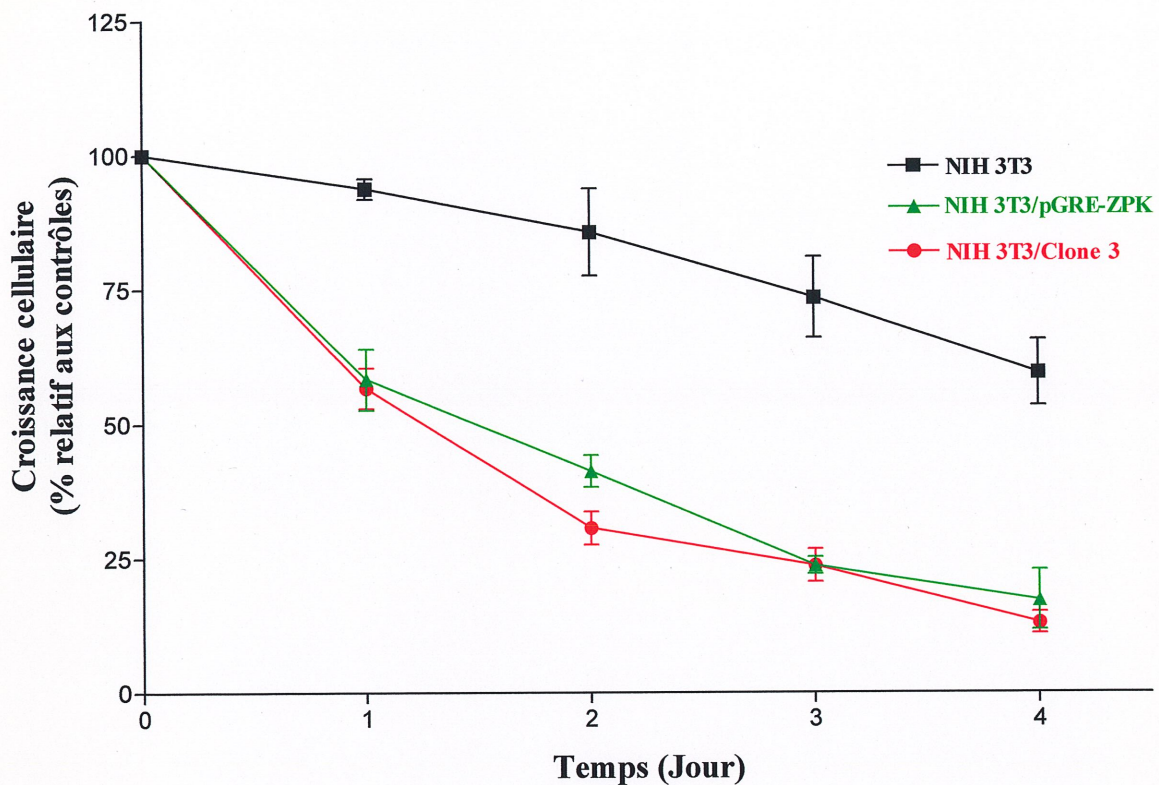


Figure 14. Inhibition de la croissance par expression inductible de ZPK. Courbe de croissance effectuée sur une période de 5 jours pour les populations de cellules NIH 3T3 parentales (NIH 3T3), NIH 3T3/pGRE5.2-ZPK et NIH 3T3/Clone 3. Au jour -1 (24 h. précédent l'induction), les cellules ont étéensemencées à une densité de 5000 à 6000 cellules par pètri pour ensuite procéder au début de l'induction et au dénombrement (jour 0). Les données démontrent les pourcentages relatifs aux contrôles non induits de chacune des populations (*i.e.* chaque population est comparée à son propre contrôle non induit). Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart type de 7 expériences.

inhibition de la croissance.

2.7.2 Effet de l'expression de ZPK sur le taux de synthèse d'ADN mesuré par incorporation de [³H]thymidine

En utilisant comme précurseur la thymidine marquée au [³H] et des marquages sur de courtes périodes (0,5-1 h.), le taux de synthèse de l'ADN et la capacité des cellules à la réplication pour la période donnée peuvent être estimés. C'est avec cet objectif que des études d'incorporation de [³H]thymidine ont été entreprises. Les trois populations utilisées lors des expériences de mesure de croissance ont été réutilisées ici. Le marquage a été effectué sur une période d'une heure précédée par 16h d'incubation avec l'agent inducteur. Puis, l'incorporation de thymidine a été déterminée par comptage à l'aide d'un appareil à scintillation liquide. Les mesures d'incorporation démontrent que l'induction de l'expression de ZPK inhibe la synthèse de l'ADN (Figure 15.). Après 16h d'induction, avec la dexaméthasone, la population de cellules NIH 3T3/Clone 3 démontre un pourcentage d'incorporation relatif de 35% comparativement à cette même population n'ayant subi aucune induction de l'expression de ZPK. Pour la population NIH 3T3/pGRE5.2-ZPK, c'est une incorporation de thymidine d'environ 55% qui est observée. Ces résultats démontrent que le taux d'incorporation de thymidine dans l'ADN pour ces deux populations est diminué de 45 à 65% suite à l'induction de l'expression de ZPK. En comparant ces résultats à la population de NIH 3T3 (90% d'incorporation relative), on peut dire que la diminution du taux de synthèse de l'ADN est significative pour les cellules exprimant ZPK. En faisant un rapprochement hypothétique entre la synthèse d'ADN et la prolifération cellulaire, on peut suggérer que la croissance des cellules est ralentie ou inhibée. Ces résultats viennent appuyer ceux obtenus précédemment par expression constitutive et suggèrent de nouveau

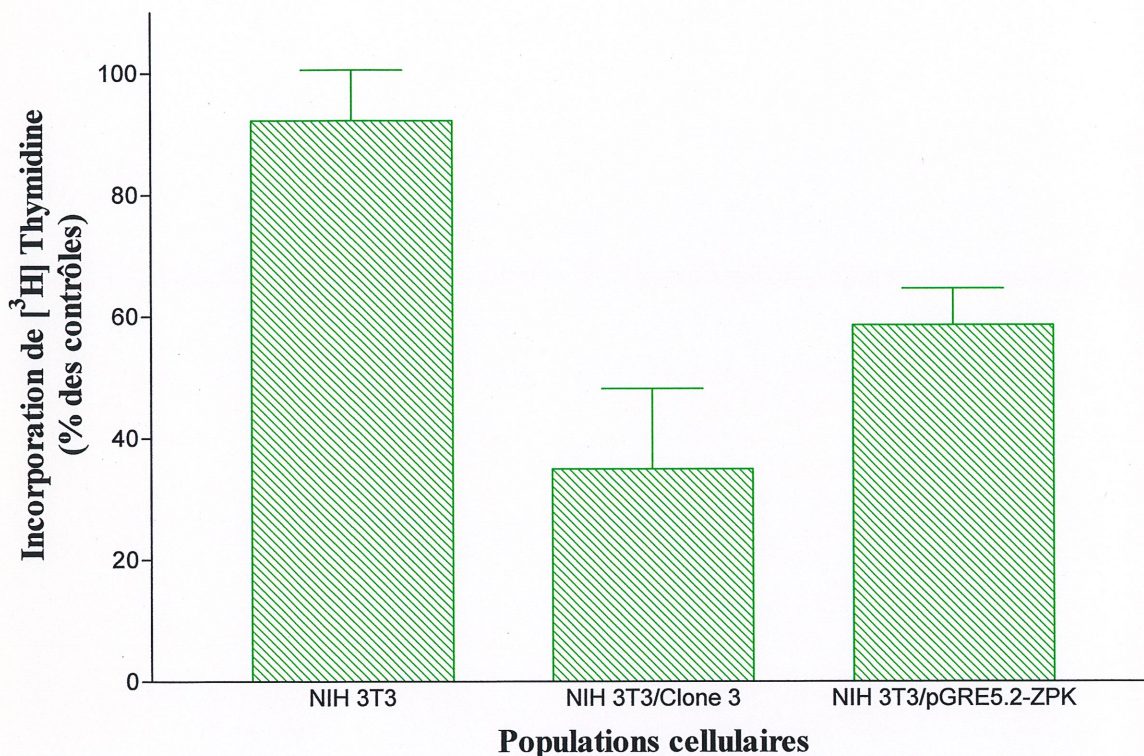


Figure 15. Mesure du taux d'incorporation de $[^3\text{H}]$ thymidine dans les cellules NIH 3T3 exprimant de façon inducible ZPK. Graphique démontrant le pourcentage d'incorporation de $[^3\text{H}]$ thymidine caractéristique de la synthèse d'ADN pour les populations NIH 3T3, NIH 3T3/pGRE5.2-ZPK et NIH 3T3/Clone 3. Les cellules ont étéensemencées à une densité de 80% avant de subir une induction pour une période de 16h. Finalement, un marquage d'une heure avec la thymidine radioactive a été effectué. Les résultats représentent les moyennes \pm l'écart type de 8 expériences. Les données démontrent les pourcentages relatifs aux contrôles non induits de chacune des populations (*i.e.* chaque population est comparée à son propre contrôle non induit).

un rôle pour la protéine ZPK dans les mécanismes de contrôle de la prolifération cellulaire.

Ces dernières expériences ne permettent pas encore de cibler l'effet réel de ZPK sur les cellules. Elles montrent que l'expression de *ZPK* mène à une inhibition ou à un ralentissement de la croissance cellulaire.

CHAPITRE 3

DISCUSSION

Le contrôle de la croissance cellulaire est un processus biologique très ordonné qui dépend de l'engagement combiné de nombreux signaux exerçant des actions positives ou négatives. L'activité de ces signaux joue un rôle crucial pour le maintien de l'homéostasie chez les organismes supérieurs (Eva *et al.*, 1992). Les mécanismes moléculaires qui régissent le contrôle négatif de la croissance cellulaire sont très complexes et la diversité des signaux rencontrés dans le contexte de l'arrêt de croissance, de la différenciation et de la survie cellulaire sont nombreux. L'étude globale de ces mécanismes devient ainsi très importante.

Plusieurs signaux participent au phénomène de régulation négative de la croissance. Malgré cette diversité, seulement quelques réponses sont observables chez la cellule. Des délais au niveau du cycle cellulaire (arrêt de croissance), de la différenciation cellulaire, la mort cellulaire programmée et la nécrose cellulaire sont autant de phénomènes qui participent au maintien de l'homéostasie et qui englobent les différents signaux de croissance négative (Liebermann *et al.*, 1995). Bien qu'on commence à approfondir nos connaissances sur les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'arrêt de croissance et à l'apoptose, il n'en demeure pas moins que la compréhension du fonctionnement du réseau de gènes, exerçant des rôles majeurs dans l'inhibition, n'est pas parfaite. Comprendre comment les contrôles négatifs sur la croissance sont régulés, connaître les fonctions des gènes impliqués et décortiquer le phénomène dans son ensemble est un énorme défi pour la recherche dans l'ultime vision d'améliorer la lutte contre les pathologies humaines qui s'y rattachent.

Nos études effectuées au cours des deux dernières années, avaient pour but d'approfondir le rôle de la protéine ZPK sur le contrôle de la prolifération cellulaire. La fonction de la protéine sérine/thréonine kinase ZPK, dans la cellule, n'est pas encore connue. Lors des nombreuses études réalisées, les seules qui permettaient d'émettre des suggestions sur les rôles possibles de ZPK étaient des études d'expression en hybridation *in situ*. Les résultats obtenus par cette technique pouvaient nous amener à suggérer un rôle au niveau du développement et de la différenciation cellulaire. En effet, le gène ZPK est majoritairement exprimé dans des populations de cellules différenciées. De plus, ce patron d'expression spécifique, au stade adulte et embryonnaire chez la souris, permet d'émettre l'hypothèse que ZPK est un gène exerçant un rôle probable dans le contrôle des processus de croissance cellulaire et/ou de différenciation. Mon projet s'insère dans la poursuite de l'objectif ultime de déterminer la fonction cellulaire de la protéine ZPK. L'objectif était de prospecter le terrain du contrôle de la croissance cellulaire afin de vérifier ce que la sur-expression de ZPK apportait comme modifications au niveau de la croissance des cellules.

Mes travaux ont permis de montrer, pour la première fois, l'évidence que la sur-expression de ZPK dans la lignée de cellules NIH 3T3 inhibe la croissance cellulaire. Ce modèle cellulaire fibroblastique est souvent utilisé dans des études de croissance. Les approches expérimentales permettant de mettre à jour l'implication d'une protéine dans ce type de processus sont très diversifiées. L'approche utilisée pour démontrer l'implication de ZPK dans le contrôle de la prolifération a été l'obtention de la sur-expression de la protéine par l'entremise de vecteurs d'expression. Cette approche englobait des expériences réalisées avec un vecteur d'expression constitutive (essais de formation de colonies) et avec un vecteur d'expression inductible (courbes de croissance et mesure de la synthèse d'ADN par l'incorporation de [³H]thymidine). Ces dernières procédures (expression inductible) ont été réalisées avec des populations de cellules NIH 3T3 transfectées pouvant être induites à l'expression de ZPK par un traitement à la dexaméthasone.

3.1 La sur-expression de ZPK inhibe la croissance des NIH 3T3.

J'ai démontré, dans un premier temps, que la transfection stable dans les NIH 3T3 d'un vecteur exprimant ZPK, réduit la croissance cellulaire (>97%) comparativement à ce que l'on obtient après la transfection avec un vecteur n'exprimant pas ZPK (Figure 9.). L'arrêt de croissance se visualise par le fait que très peu de cellules réussissent à survivre suite à la sur-expression du gène. Cette inhibition de croissance est aussi en relation avec la quantité de plasmides transfectée dans les cellules. Le nombre de clones obtenu par transfection diminue lorsque la quantité de plasmides augmente (Figure 10.). L'inhibition de la formation de colonies est clairement établie pour ZPK. En utilisant le même essai, des protéines comme p53, pRb, p107 et Mad (Zhu *et al.*, 1993 ; Västrik *et al.*, 1995) ont démontré leur implication dans l'inhibition de la croissance. Les résultats similaires obtenus suggèrent, à l'instar de ces protéines, que ZPK a un potentiel comparable permettant d'inhiber la croissance cellulaire. Les réponses cellulaires s'observant par l'inhibition de la croissance sont relativement variées. Dans ce contexte, il faut prendre note que ces expériences d'essais de formation de colonies ne permettent pas de conclure que cet effet négatif sur la croissance observé pour ZPK est dû à un blocage au niveau du cycle cellulaire, à une perte de la viabilité des cellules ou encore à une implication de ZPK dans l'arrêt de croissance précédant une différenciation cellulaire. L'inhibition de la formation de colonies peut être attribuée à l'un ou l'autre de ces mécanismes.

On sait que la phosphorylation est un événement important dans les processus de signalisation cellulaire. Les PKs ont, depuis quelques années, des rôles attribués au contrôle de la prolifération (plus souvent positive) et de la différenciation. La signalisation cellulaire transporte des signaux cellulaires qui se dirigent au noyau pour y réguler l'expression génétique et les processus de prolifération cellulaire. La croissance est régulée par des points de restriction dans le cycle cellulaire (Hartwell, 1992). Quand une cellule complète une mitose et entre en G1, une décision

est prise soit pour progresser dans la phase S ou encore se diriger vers l'arrêt de croissance. Dans le contexte d'un organisme multicellulaire, la décision d'aller vers l'arrêt de croissance peut venir de plusieurs niveaux. Ces niveaux incluent l'entrée en G0 qui peut être à la fois réversible (quiescence) ou irréversible (sénescence), la différenciation et la mort cellulaire (Philipson et Sorrentino, 1991). La croissance cellulaire est un processus actif contrôlé par l'action de nombreux et différents acteurs, dont les signaux inhibiteurs. Ces derniers incluent la famille des cytokines inflammatoires comme *TNF- α* (Sugarman, *et al.*, 1987) et *TGF- β* (Laiho *et al.*, 1990), les gènes supresseurs de tumeurs comme p53 (Lin *et al.*, 1992), les gènes impliqués dans la différenciation comme *myoD* (Sorrentino *et al.*, 1990) et les PKs comme la tyrosine kinase nucléaire c-Abl (Sawyers *et al.*, 1994) et la sérine/thréonine kinase cytoplasmique « apoptose signal-regulating kinase » (ASK1) (Ichijo *et al.*, 1997).

3.2 L'inhibition de la croissance requiert un site de fixation de l'ATP intact

Le mécanisme par lequel la protéine ZPK inhibe la prolifération cellulaire lorsqu'elle est sur-exprimée, demeure obscur. Par contre, l'activité biologique sérine/thréonine kinase de ZPK fournit un indice sur le mécanisme potentiel d'action de l'effet négatif sur la croissance qui est observé. L'intérêt était de déterminer comment l'expression constitutive d'un mutant catalytique de ZPK pouvait réagir dans ce processus. L'obtention d'un mutant du codon lysine 185 (K) inclut dans le sous-domaine kinase II, a permis de démontrer que l'activité intrinsèque de ZPK avait potentiellement une implication dans l'inhibition de croissance. Cette lysine est reconnue, chez ce type de protéine, pour permettre la fixation de l'ATP et catalyser le transfert du groupement γ -phosphate (Hanks, 1991). La substitution (K/R) (AAG/AGG), pour ce site particulier du domaine catalytique, a été rapporté pour plusieurs autres membres de cette famille comme résultant à la perte de l'activité kinase (Lin *et al.*, 1995 ; Xu *et al.*, 1995). L'utilisation d'un vecteur contenant l'ADNc de cette forme mutante a démontré lors de sur-expression que le potentiel inhibiteur sur la croissance de ZPK était complètement abolie (Figure 11.). Ces

résultats suggèrent par conséquent que la protéine ZPK exercerait probablement son effet négatif sur la prolifération cellulaire par la phosphorylation et l'activation de molécules de signalisation en aval. Ils démontrent que le site de fixation de l'ATP de ZPK est nécessaire à l'inhibition de la croissance cellulaire. Cette démonstration permettrait d'affirmer et d'imaginer concrètement que ZPK activerait des cibles moléculaires qui permettraient à la cellule de répondre par un des processus caractérisant l'inhibition de croissance. Ces processus seraient actifs et demanderaient la présence de l'activité kinase et l'implication possible de ZPK dans une voie de transduction. Il resterait à démontrer clairement que ce mutant ne possède réellement pas d'activité kinase intrinsèque.

En ce qui concerne l'implication d'une protéine sérine/thréonine kinase cytoplasmique dans des processus menant à l'observation de l'inhibition de la prolifération cellulaire, les précédents sont plutôt rares. On connaît l'implication du récepteur sérine/thréonine kinase TGF- β dans l'arrêt de croissance, l'apoptose et la différenciation (Oberhammer *et al.*, 1992). Jusqu'à maintenant, davantage de protéines tyrosine kinases nucléaires ont démontré des capacités inhibitrices sur la croissance : c-Abl, Wee-1 et Rak sont trois de ces protéines qui ont des rôles dans la régulation négative de la croissance lorsqu'elles sont sur-exprimées dans des lignées cellulaires (Pendergast, 1996). Il y a également la protéine c-Fes, une autre tyrosine kinase, mais cette fois cytoplasmique, qui apparaît promouvoir l'arrêt de la croissance relié à la différenciation terminale des cellules hématopoïétiques myéloïdes après transfection (Yu *et al.*, 1989). Je m'attarderai finalement sur l'exemple très intéressant de la protéine ASK1, une sérine/thréonine kinase membre de la famille des MAPKs, se retrouvant au niveau MAPKKK, tout comme ZPK. Cette kinase active les voies des JNKs et de p38 et démontre une implication dans le processus d'apoptose induit par la cytokine inflammatoire TNF- α (Ichijo *et al.*, 1997). Ce processus de mort cellulaire programmée est une des réponses cellulaires attribuées à l'activation de la voie des JNKs/SAPKs. Tous ces exemples sont cohérents avec la possibilité que certaines PKs puissent agir comme régulateur négatif de la croissance cellulaire. Cette idée est de plus en plus supportée par de nombreuses études, dont la démonstration récente que le récepteur tyrosine

kinase du « fibroblast growth factor 3 » (FGF-3) est un régulateur négatif de la croissance des os chez la souris (Deng *et al.*, 1996).

3.3 ZPK dans la signalisation cellulaire

Les PKs exercent habituellement leurs fonctions par l'entremise des voies de transduction. Les études sur les partenaires dans ces voies de signalisation sont une cible intéressante d'investigation pour démontrer plus précisément comment cette protéine exerce sa fonction. Les facteurs qui contrôlent l'activité de la protéine ZPK en amont et en aval sont probablement importants pour la réalisation de la fonction et la reconnaissance de ces partenaires et l'étude de ceux-ci aiderait sûrement à caractériser davantage son rôle.

Les candidats potentiels permettant à ZPK d'exercer sa fonction par l'entremise des voies de transduction, peuvent inclure les membres de la famille des MAPKs. En effet, il a été démontré récemment que les homologues de rat (MUK) et de souris (DLK) pouvaient activer la voie des JNKs/SAPKs ainsi que celle de p38 lorsqu'elles étaient transfectées de façon transitoire des cellules NIH 3T3 (Hirai *et al.*, 1996 ; Fan *et al.*, 1996). Ces kinases sont connues pour être activées et modulées par des stimuli extracellulaires comme des cytokines inflammatoires et des formes variées de stress environnementaux (chocs thermiques, radiations, chocs osmotiques). Les réponses produites par ces stimuli se traduisant par l'arrêt de croissance, la mort cellulaire et des réparations cellulaires (Kyriakis et Avruch, 1996). En accord avec ces différentes observations, on est tenté de suggérer que l'arrêt de croissance observé suite à la sur-expression de ZPK pourrait être attribuable à l'activation de cette famille de PKs. De plus, l'exemple récent de la protéine ASK1, démontre que les MAPKKKs peuvent avoir un rôle dans le mécanisme d'apoptose induit par les stress et les cytokines (Ichijo *et al.*, 1997). Ce résultat amène également

des suggestions quant à la possible implication de ZPK dans le processus de la mort cellulaire programmée.

Les GTPases Cdc42 et Rac1 sont d'autres candidats pouvant amener des indices sur la manière dont ZPK exercerait son action. Les faits inhérents suggèrent que l'homologue de souris DLK lierait ces GTPases à la voie des JNKs et p38 (Fan *et al.*, 1996). La démonstration que Cdc42 avait la capacité d'inhiber la progression du cycle en G1/S par un mécanisme qui requerrait l'activation de p38 amène également des arguments en faveur de possibles interactions entre ZPK et ces protéines (Molnar *et al.*, 1997). Jusqu'à maintenant, l'accent a été mis sur la voie des JNKs, mais certaines fonctions de ZPK pourraient être exercées par l'entremise de p38. Cette voie se retrouve également activée par plusieurs stimuli extracellulaires identiques à ceux activant les JNKs et répond à ceux-ci par l'apoptose et l'inhibition de la progression du cycle cellulaire en G1/S (Kyriakis et Avruch, 1996). L'effet de ZPK sur la croissance pourrait donc être issue de l'inhibition de la progression du cycle cellulaire ciblée par la GTPase Cdc42 et soumise à l'activation de la voie p38.

En plus des MAPKs et des GTPases, ZPK pourrait interagir *in vivo* avec des protéines signalétiques contenant des structures protéiques comme les motifs « Leucine zipper » ou les domaines SH3. Les domaines « Leucine zipper » pourraient potentiellement jouer un rôle similaire à celui des facteurs de transcription, en permettant l'établissement de contacts intermoléculaires essentiels et préalables à l'activation de la fonction kinase intrinsèque de la protéine. Les domaines SH3 ont la capacité de lier des régions riches en proline (contenant le motif PXXP) similaires à celles (2) que ZPK possède dans sa structure (Figure 4.). Ces deux motifs protéiques revêtent un intérêt particulier, à la fois parce qu'ils sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires, incluant la régulation des PKs (pour les domaines SH3), mais également parce que certains membres de la famille MLK contiennent ces deux types de structures. C'est le cas de MLK3/SPRK (Gallo *et al.*, 1994). Ce membre des MLKs active les voies JNK et p38 (Tibbles *et al.*, 1996) et lie les GTPases Cdc42 et Rac1 *in vivo* (Teramoto *et*

al., 1996). Cette protéine, dont aucune fonction n'est jusqu'à maintenant suggérée, pourrait s'avérer une candidate intéressante pour de futures investigations pouvant permettre la mise à jour de la fonction de ZPK. La connaissance des partenaires, incluant les activateurs et les substrats, devient un atout pour la compréhension de la fonction d'une protéine de signalisation.

3.4 Inhibition de la croissance par expression induite de ZPK

Parce que l'activité suppressive de ZPK sur la croissance est obtenue par la sur-expression de la protéine, il est possible que cette activité observée ne reflète pas exactement le rôle physiologique réel de la protéine. Il est important, dans ce type d'expériences, que l'on puisse interpréter les résultats en termes de réponses *in vivo* ou du moins les interpréter avec la compréhension des différences entre les mesures *in vitro* et *in vivo*. Les études de sur-expression nous guident dans une direction, nous amènent des indices sur la fonction d'une protéine, mais une détermination plus précise, plus fine de la fonction requiert des expérimentations supplémentaires. Dans le cas des études de croissance, l'utilisation d'une expression réalisée sous l'influence d'un promoteur inductible devenait importante afin de déterminer si l'effet négatif sur la croissance de la protéine ZPK reflétait réellement un rôle physiologique.

C'est dans cette perspective, qu'un système permettant de contrôler l'expression de ZPK a été élaboré. Le vecteur d'expression pGRE5.2, inductible par la dexaméthasone, a permis de démontrer que les cellules sur-exprimant ZPK avaient un taux de croissance inférieur à celles ne l'exprimant pas (Figure 14.). Cette démonstration de croissance, par expression induite de ZPK échelonnée sur 5 jours, suggère vraiment que la fonction normale de ZPK se rattache aux modes de régulation négative de la croissance. De plus, l'utilisation de ce type de vecteur a permis de démontrer que le taux de synthèse d'ADN mesuré par incorporation de [³H]thymidine était moindre lorsque l'expression de ZPK était induite. Ce dernier paramètre est grandement utilisé et

permet, par la mesure de la synthèse d'ADN, de faire un rapprochement subjectif avec le taux de croissance des cellules. Ces études ne permettent pas encore de cibler réellement la fonction de ZPK. Elles permettent toutefois de démontrer, suite à l'induction de l'expression, que les cellules réagissent rapidement et donnent une réponse cellulaire caractéristique de l'arrêt de croissance. On visualise très bien qu'après 24h d'induction, le taux d'incorporation de [³H]thymidine est de 35% à 55% inférieur chez les cellules induites à l'expression (Figure 15.) et que la croissance relative de ces mêmes est près de 50% inférieure après cette même période (Figure 14.).

Précédemment, par l'utilisation d'essais de formation de colonies, on observait que la sur-expression de ZPK abolissait presque complètement la capacité des cellules à former des colonies (expression échelonnée sur 2 à 3 semaines). Aucune indications ne nous permettaient de cibler le moment exact où l'inhibition de croissance survenait. Par des études de croissance échelonnées sur 5 jours on réalise que ZPK agit rapidement sur les cellules suite à son expression (Figure 14.). La diminution de la synthèse d'ADN après 24 h. d'induction démontre que la sur-expression de ZPK mène rapidement à une perte de la capacité de synthèse de l'ADN chez les cellules. Ce résultat se compare avantageusement à ce qui est démontré pour les protéine ASK1 (Ichijo *et al.*, 1997) et « gut-enriched Krüppel-like factor » (GKLF). Pour cette dernière, on suggère que son effet inhibiteur sur la croissance serait caractéristique de l'arrêt de la progression du cycle cellulaire, plus particulièrement à la transition entre les phases G1/S (Shields *et al.*, 1996).

Les cellules fibroblastiques de souris NIH 3T3 répondent au traitement de la dexaméthasone par un faible ralentissement de leur taux de croissance. Une étude précédente, ayant utilisé un vecteur de même type et portant sur le rôle d'une protéine dans le contrôle négatif de la prolifération, ne nous renseignait pas sur la réponse de cette lignée cellulaire à ce glucocorticoïde (Sawyers *et al.*, 1994). Nos résultats nous démontrent que la lignée NIH 3T3 répond au traitement à 25 nM de dexaméthasone par un faible ralentissement de son taux de croissance.

Cependant, il n'en demeure pas moins que les inhibitions de croissance et d'incorporation de thymidine observées, lors de l'induction d'expression de ZPK, sont beaucoup plus importantes et permettent de conclure à une inhibition de la croissance et de la synthèse d'ADN.

3.5 ZPK et la différenciation cellulaire ?

ZPK pourrait également contribuer à la différenciation terminale des cellules en permettant l'arrêt de la prolifération cellulaire précédant l'entrée dans la différenciation. L'expression de *ZPK* dans les tissus ayant un taux de renouvellement cellulaire élevé comme dans la peau et l'intestin est une observation très intéressante pour la détermination du rôle de cette sérine/thréonine kinase. L'expression dans les villosités intestinales, régions supérieures au compartiment de cellules en prolifération de la crypte, suggère un rôle pour ZPK dans la maturation des cellules épithéliales de ce tissu. Cette portion de l'épithélium intestinal regroupe les cellules, en arrêt de prolifération, qui ont entamé le processus de différenciation qui les mènera vers l'extrémité de la crypte où culmine par l'apoptose la maturation de ces cellules. La localisation de ZPK dans ce tissu, couplé à la démonstration de son implication dans l'arrêt de croissance, pourrait amener à suggérer des rôles physiologiques potentiels dans cet environnement.

ZPK pourrait agir comme gène supprimant la prolifération cellulaire des cellules épithéliales au niveau des villosités. L'état de prolifération des cellules de cette région contraste de la prolifération qui existe à la base de la crypte où l'expression de *ZPK* est absente. *ZPK* pourrait également favoriser la différenciation terminale par l'activation de gènes requis pour l'obtention du phénotype différencié des cellules épithéliales. Ces deux fonctions ne sont pas mutuellement exclusives. *ZPK* pourrait potentiellement les posséder toutes les deux à la manière similaire du gène *myoD* qui permet à la fois la différenciation terminale myogénique et la sortie du cycle

cellulaire (Halevy *et al.*, 1995). Le gène *GKLF* est également exprimé dans les régions en arrêt de prolifération du tractus intestinal, en plus de démontrer un rôle potentiel dans l'arrêt du cycle cellulaire en G1/S (Shields *et al.*, 1996). La différenciation terminale à l'extrémité des villosités se caractérise par la mort cellulaire programmée des cellules. Une implication, dans celle-ci, serait également une fonction biologique à prendre en considération pour ZPK. Le modèle de l'intestin est très intéressant pour faire l'investigation de la fonction de ZPK. Le même raisonnement s'applique au modèle de la peau, où ZPK semble posséder un patron d'expression similaire dans les couches non prolifératives et différenciées des kératinocytes. L'apoptose est aussi l'aboutissement qui attend ces cellules à la fin de leur différenciation.

La démonstration, dans la lignée de cellules carcinomique embryonnaire de souris P19, de l'augmentation d'expression de ZPK, suite à l'induction de la différenciation, démontre une implication dans le contrôle des processus de la différenciation cellulaire. Ces cellules une fois exposées à l'acide rétinoïque sont induites à la différenciation en neurones et cette induction est accompagnée d'une augmentation notable et relativement rapide de l'expression de ZPK (Daigle *et al.*, non publiés¹). La combinaison des résultats obtenus, dans les différentes études cellulaires *in vitro*, permet de suggérer un rôle, pour ZPK, dans l'arrêt de la prolifération précédant l'entrée en différenciation.

Une cible importante de l'étude du contrôle de la croissance cellulaire est de comprendre comment les signaux communiquent entre eux. ZPK, pour exercer sa fonction dans l'arrêt de la croissance doit transmettre son activité à la machinerie responsable de l'action inhibitrice. Les GTPases et la voie des JNKs ont déjà une main mise sur des interactions possibles avec ZPK. Par contre, des investigations, avec des gènes d'importance comme p53, pourraient être faites. Ce gène est connu pour avoir des rôles reliés à l'arrêt de croissance en G1/S, dans l'induction de l'apoptose et dans la prévention de la croissance cellulaire suite à des dommages à l'ADN (Donehower et Bradley, 1993). Il a été démontré que la protéine JNK avait la capacité de lier et

de phosphoryler p53 (Milne *et al.*, 1995 ; Alder *et al.*, 1997). D'autres recherches pourraient approfondir les résultats suggérés par l'équipe d'Holzman du Michigan. Ces résultats démontrent que DLK (l'homologue de souris de ZPK) se retrouve dans une voie prenant naissance avec la protéine v-Src et menant à l'activation des JNKs (Fan *et al.*, 1996). Src est une protéine signalétique importante qui a récemment démontré une implication dans la réponse cellulaire induite par des stress génotoxiques (Liu *et al.*, 1996). L'activation des JNKs par ces stress diminue chez les cellules c-Src négatives. Ces observations permettent d'amener des hypothèses sur l'implication possible de ZPK dans l'activation de la voie JNK répondant aux stress extracellulaires. Comprendre comment les signaux négatifs sur la croissance, engendrés par ZPK, se propagent dans la cellule, permettra sûrement d'apporter des éclaircissements sur la fonction réelle de cette protéine sérine/thréonine kinase.

La démonstration de l'implication de ZPK dans le contrôle de la prolifération, ne ferme pas la porte à d'autres fonctions que la protéine pourrait posséder. La démonstration de l'augmentation de l'expression dans les processus de régénération chez le foie (après hépatectomie) et le pancréas (après pancréatectomie) (Douziech *et al.*, non publiés¹) pourrait annoncer un rôle possible dans la régénération. Des rôles potentiels, dans la prolifération cellulaire ou encore dans la conservation de l'état différencié des cellules qui prolifèrent. Une régulation de l'expression de ZPK dans la régénération des fractures du fémur chez le rat a aussi été observée. Le maximum d'expression coïncide avec la chondrogénèse et la formation des os (Matsui *et al.*, 1996). La caractérisation des rôles de cette protéine sérine/thréonine kinase devient un défi intéressant pour la compréhension des mécanismes cellulaires de prolifération et de différenciation cellulaire mais également dans la mesure où ces rôles pourraient se rapporter éventuellement à certains désordres physiologiques humains incluant bien entendu l'avènement de cancers.

On pourrait se poser la question à savoir si ZPK a le potentiel d'un gène supresseur de tumeur ? La localisation chromosomique humaine dans la région 12q13 permet peut-être d'en arriver à cette conclusion. Cette région subie des réarrangements dans certaines tumeurs solides, mais rien encore ne laisse présager une telle fonction pour ZPK. La démonstration d'une perte d'activité, par mutation, menant au développement de tumeurs deviendrait un élément important pouvant répondre à cette question. Pour l'instant, on retiendra que l'inhibition de la prolifération démontrée, par essais de formation de colonies, est similaire à ce qui avait été observé initialement pour les gènes supresseurs de tumeurs p53 et pRb.

CONCLUSION

Ce travail a permis de montrer que la protéine sérine/thréonine kinase ZPK est impliquée dans la régulation de la croissance cellulaire (Bergeron *et al.*, 1997) (Annexe 1.). En analysant par diverses techniques, l'implication moléculaire de la sur-expression de cette protéine, j'ai réalisé que ZPK était une protéine engagée dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Les études effectuées ont mis l'emphasis sur la détermination de la réponse cellulaire qui survenait suite à la sur-expression de ZPK. Dans la poursuite de mon objectif de caractériser l'implication de ZPK dans la prolifération cellulaire chez les NIH 3T3, j'ai mis sur pied des outils moléculaires intéressants. J'ai élaboré des populations de cellules répondant à un agent inducteur par la sur-expression de ZPK. Ce système permet d'obtenir une forte expression contrôlée dans les cellules NIH 3T3. J'ai obtenu un ADNc de ZPK couplé à un déterminant antigénique (HA). Ce système de révélation immunologique indirect permet de suppléer à la présence d'un anticorps anti-ZPK.

Maintenant, la porte est ouverte sur la dissection des contrôles moléculaires dans lesquels ZPK est vraiment impliquée. Est-ce une implication dans l'arrêt de croissance au niveau du cycle cellulaire, de l'apoptose, de la différenciation cellulaire ou encore dans plus d'un de ces processus ? Le thème central des prochaines investigations sera la meilleure compréhension des programmes d'arrêt de croissance. Il faudra faire ressortir les moyens par lesquels on peut activer ZPK et les partenaires avec lesquels cette protéine interagit.

Il sera important de considérer les caractéristiques cellulaires et les stimuli spécifiques à ces cellules. ZPK pourrait avoir des rôles différents dépendant du type cellulaire dans lequel elle est exprimée. Sans parler des partenaires, dont l'expression pourrait être régulé différemment de celle de ZPK, laissant ainsi toute grande ouverte la porte quant à des rôles cellules ou tissus spécifiques. Des systèmes cellulaires *in vitro* et *in vivo* qui nous permettent d'analyser et de

distinguer entre les voies d'arrêt de croissance et d'apoptose, induites dans les mêmes et différentes cellules, seront un outil indispensable pour élucider la fonction complexe de ZPK dans les circuits du contrôle de l'arrêt de croissance. Les différents modèles permettront également de spécifier où se retrouve réellement ZPK dans la signalisation intracellulaire.

Il serait intéressant, dans la poursuite du projet, de vérifier l'absence d'activité catalytique chez le mutant (K/R) de ZPK. J'ai démontré que le site de fixation de l'ATP était nécessaire pour inhiber la formation de colonies. Savoir que ce mutant ne possède pas d'activité catalytique viendrait compléter les hypothèses suggérées. De plus, l'obtention d'un vecteur inducible contenant ce mutant serait un atout important. Il permettrait de confirmer les résultats de croissance et de synthèse d'ADN réalisées avec la forme normale de ZPK. J'ai réalisé des expériences nous suggérant que l'activité kinase intrinsèque de ZPK est nécessaire pour l'accomplissement de la fonction inhibitrice. La démonstration de l'absence d'activité catalytique apparente chez le mutant du site de fixation de l'ATP (K/R) viendrait raffermir cette position.

Des expériences pouvant définir une implication, pour la protéine ZPK, dans l'inhibition de la progression du cycle cellulaire ou la mort cellulaire programmée deviennent nécessaires. Plusieurs modèles ou expériences peuvent nous aider à approfondir la question. La démonstration de l'effet de l'inhibition de contact sur l'expression endogène de ZPK chez les NIH 3T3 et des études d'expression dans des conditions contrôlées de stimulation ou de privation en sérum pourraient permettre de déterminer si ZPK a le pouvoir d'exercer une emprise sur le cycle cellulaire. Ce type d'expérience a permis de suggérer, pour la protéine GSK-3 β , un rôle dans l'inhibition de la progression du cycle cellulaire. D'un autre côté, afin de déterminer l'effet de ZPK sur la croissance et la viabilité cellulaire, il faudrait cibler des expériences démontrant que la sur-expression de ZPK mène à l'apparition de symptômes caractéristiques de l'apoptose. Plusieurs moyens ont été développés, au cours des dernières

années, permettant de mettre à jour les principaux symptômes de l'apoptose. Finalement, l'implication de ZPK dans la signalisation en réponse au stress induisant l'apoptose, pourrait permettre de cibler la protéine vers l'une ou l'autre des voies réagissant aux stress génotoxiques, soient celles des JNKs, de p53 ou de c-Abl.

En conclusion, je crois que les prochaines études permettront de délimiter et discriminer les mécanismes moléculaires associés à l'activité de la protéine ZPK. Ils apporteront peut-être une contribution intéressante pour une meilleure compréhension de troubles physiologiques humains associés particulièrement aux cancers. Je crois que les résultats de mes études ouvriront la voie dans le futur à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de contrôle de la prolifération et la différenciation cellulaire.

ANNEXE 1

Annexe 1 manquante dans nos exemplaires.

RÉFÉRENCES

ALBERTS, A., D. BRAY, J. LEWINS, M. RAFF, K. ROBERTS et J.D. WATSON. 1994. Molecular Biology of the Cell. Part IV. Éditeurs : Garland Publishers, Inc. NY & London., 1294 p.

ADLER, V., M.R. PINCUS, T. MINAMOTO, S.Y. FUCHS, M.J. BLUTH, P.W. BRANDT-RAUF, F.K. FRIEDMAN, R.C. ROBINSON, J.M. CHEN, X.W. WANG, C.C. HARRIS, et Z. RONAI. 1997. Conformation-dependent phosphorylation of p53. Proc. Natl Acad. Sci. U S A 94 (5): 1686-1691.

ATTISANO, L., J.L. WRANA, F. LOPEZ-CASSILAS et J. MASSAGUE. 1994. TGF-beta receptors and actions. Biochim. Biophys. Acta. 1222(1) : 71-80.

BERGERON, P., M. DOUZIECH, N. DAIGLE, R. et R. BLOUIN. 1997. Inhibition of cell growth by overexpression of the *ZPK* gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 202 : 613-620.

BLOUIN, R., J. BEAUDOIN, P. BERGERON, A. NADEAU, et G. GRONDIN. 1996. Cell-specific expression of the *ZPK* gene in adult mouse tissues. DNA Cell Biol. 15(8) : 631-642.

BOKOCH, G.M. et C.J. DER. 1993. Emerging concepts in the Ras superfamily of GTP-binding proteins. FASEB J. 7(9) : 750-759.

BURBELO, P.D., D. DRECHSEL et A. HALL. 1995. A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. J. Biol. Chem. 270(49) : 29071-29074.

CANO, E., et L.C. MAHADEVAN. 1995. Parallel signal processing among mammalian MAPKs. Trends Biochem. Sci. 20(3) : 117-122.

COHEN, G.B., R. REN, et D. BALTIMORE, 1995. Modular binding domains in signal transduction proteins. Cell 80(2) : 237-248.

COSO, O.A., M. CHIARIELLO, J.-C. YU, H. TERAMOTO, P. CRESPO, N. XU, T. MIKI et J.S. GUTKIND, 1995. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK /SAPK signaling pathway. *Cell* 81(7) : 1137-1146.

DENG, C., A. WYNshaw-BORIS, F. ZHOU, A. KUO, P. LEDER. 1996. Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 84 (6): 911-921.

DENHARDT, D.T. 1996. Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell : the potential for multiplex signalling. *Biochem. J.* 318 (Pt 3) : 729-747.

DÉRIJARD, B., J. RAINGEAUD, T. BARRETT, I.H. WU, J. HAN, R.J. ULEVITCH et R.J. DAVIS. 1995. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267(5198) : 682-685.

DONEHOWER, L.A. et A. BRADLEY. 1993. The tumor suppressor p53. *Biochim. Biophys. Acta* 1155(2) : 181-205.

DOROW, D.S., L. DEVREUX, et R.J. SIMPSON. 1993. Identification of a new family of human epithelial protein kinases containing two leucine/isoleucine-zipper domains. *Eur. J. Biochem.* 213(2) : 701-710.

EL-DEIRY, W.S., T. TOKINO, V.E. VELCULESCU, D.B. LEVY, R. PARSONS, J.M. TRENT, D. LIN, W.E. MERCER, K.W. KINZLER et B. VOGELSTEIN. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75(4) : 817-825.

EVAN, G.I., A.H. WYLLIE, C.S. GILBERT, T.D., LITTLEWOOD, H. LAND, M. BROOKS, C.M. WATERS, L.Z. PENN et C. HANCOCK. 1992. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69(1) : 119-128.

FAN, G., S.E. MERRITT, M. KORTENJANN, P.E. SHAW et L.B. HOLZMAN. 1996. Dual leucine zipper-bearing kinase (DLK) activates p46SAPK and p38mapk but not ERK2. *J. Biol. Chem.* 271(40) : 24788-24793.

FANGER, G.R., P. GERWINS, C. WIDMANN, M.B. JARPE et G.L. JOHNSON, 1997. MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7(1) : 67-74.

FISHER, D.E. 1994. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 78(4) : 539-542.

GALLO, K.A., M.R. MARK, D.T. SCADDEN, Z. WANG, Q. GU et P.J. GODOWSKI. 1994. Identification and characterization of SPRK, a novel src-homology 3 domain-containing proline-rich kinase with serine/threonine kinase activity. *J. Biol. Chem.* 269(21) : 15092-15100.

GOGA, A., X. LIU, T.M. HAMBUCH, K. SENECHAL, E. MAJOR, A.J. BERK, O.N. WITTE et C.L. SAWYERS. 1995. P53 dependent growth suppression by the c-Abl nuclear tyrosine kinase. *Oncogene* 11(4) : 791-799.

GORMAN, C.M., L.F. MOFFAT et B.H. HOWARD. 1982. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2(9) : 1044-1051.

GUPTA, S., T. BARRETT, A.J. WHITMARSH, J. CAVANAGH, H.K. SLUSS, B. DÉRIJARD et R.J. DAVIS. 1996. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J.* 15(11) : 2760-2770.

HALEVY, O., B.G. NOVITCH, D.B. SPICER, S.X. SKAPEK, J. RHEE, G.J. HANNON, D. BEACH et A.B. LASSAR. 1995. Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* 267(5200) : 1018-1021.

HANKS, S.K. 1991. Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol* 200 : 38-62.

HANKS, S.K. et T. HUNTER. 1995. The eucaryotic protein kinase superfamily : kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9(8) : 576-596.

HANKS, S.K., A.M. QUINN et T. HUNTER. 1988. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241(4861) : 42-52.

HARTWELL, L. 1992. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* 71(4) : 543-546.

HIBI, M., A. LIN, T. SMEAL, A. MINDEN et M. KARIN. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* 7(11) : 2135-2148.

HIRAI, S., M. IZAWA, S. OSADA, G. SPYROU et S. OHNO. 1996. Activation of the JNK pathway by distantly related protein kinases, MEKK and MUK. *Oncogene* 12(3) : 641-650.

HOLZMAN, L.B., S.E. MERRITT et G. FAN. 1994. Identification, molecular cloning, and characterization of dual leucine zipper bearing kinase. A novel serine/threonine protein kinase that defines a second subfamily of mixed lineage kinases. *J. Biol. Chem.* 269(49) : 30808-30817.

ICHIJO, H., E. NISHIDA, K. IRIE, P.T. DIJKE, M. SAITOH, T. MORIGUCHI, M. TAKAGI, K. MATSUMOTO, K. MIYAZONO et Y. GOTOH. 1997. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275(5296) : 90-94.

JOHNSON, L.N., M.E. NOBLE et D.J. OWEN. 1996. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* 85(2) : 149-158.

JOHNSON, G.L. et R.R. VAILLANCOURT. 1994. Sequential protein kinase reactions controlling cell growth and differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6(2) : 230-238.

KALLUNKI, T., B. SU, I. TSIGELNY, H.K. SLUSS, B. DÉRIJARD, G. MOORE, R. DAVIS et M. KARIN. 1994. JNK2 contains a specificity-determining region responsible for efficient c-Jun binding and phosphorylation. *Genes Dev.* 8(24) : 2996-3007.

KYRIAKIS, J.M. et J. AVRUCH. 1996. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays* 18(7) : 567-577.

KOCH, C.A., D. ANDERSON, M.F. MORAN, C. ELLIS et T. PAWSON. 1991. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 252(5006) : 668-674.

LAIHO, M., J.A. DECAPRIO, J.W. LUDLOW, D.M. LIVINGSTON et J. MASSAGUE. 1990. Growth inhibition by TGF-beta linked to suppression of retinoblastoma protein phosphorylation. *Cell* 62(1) : 175-185.

LANDSCHULZ, W.H., P.F. JOHNSON et S.L. MCKNIGHT. 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240(4860) : 1759-1764.

LEWIN, B. 1994. *Genes V*. Éditeurs : Oxford University Press, Inc. Oxford, New York., 1272 p.

LIEBERMANN, D.A., B. HOFFMAN et R.A. STEINMAN. 1995. Molecular controls of growth arrest and apoptosis : p53-dependent and independent pathways. *Oncogene* 11(1) : 199-210.

LIN, A., A. MINDEN, H. MARTINETTO, F.-X. CLARET, C. LANGE-CARTER, F. MERCURIO, G.L. JOHNSON et M. KARIN. 1995. Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science* 268(5208) : 286-290.

LIN, D., M.T. SHIELDS, S.J. ULLRICH, E. APPELLA et W.E. MERCER. 1992. Growth arrest induced by wild-type p53 protein blocks cells prior to or near the restriction point in late G1 phase. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 89(19) : 9210-9214.

LIU, Z.G., R. BASKARAN, E.T. LEA-CHOU, L.D. WOOD, Y. CHEN, M. KARIN et J.Y. WANG. 1996. Three distinct signalling responses by murine fibroblasts to genotoxic stress. *Nature* 384 (6606): 273-276.

MADER, S. et J.H. WHITE. 1993. A steroid-inducible promoter for the controlled overexpression of cloned genes in eukaryotic cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90(12) : 5603-5607.

MANIATIS, T., E.F. FRITSCH et J. SAMBROOK. 1982. Molecular cloning : a laboratory manual. Éditeurs : Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory.

MANSER, E., E.T. LEUNG, H. SALIHUDDIN, Z.S. ZHAO et L. LIM. 1993. A non-receptor tyrosine kinase that inhibits the GTPase activity of p21cdc42. *Nature* 363(6427) : 364-367.

MARSHALL, C.J. 1994. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4(1) : 82-89.

MATA, M., S.E. MERRITT, G. FAN, G.G. YU et L.B. HOLZMAN. 1996. Characterization of dual leucine zipper-bearing kinase, a mixed lineage kinase present in synaptic terminals whose phosphorylation state is regulated by membrane depolarization via calcineurin. *J. Biol. Chem.* 271(28) : 16888-16896.

MATSUI, N., G. SARKAR, T. SHUTO, J. MARRS, J.T. BRONK, K. MIZUNO et M.E. BOLANDER. 1996. Identification of a dual leucine zipper kinase involved in rat fracture repair. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229(2) : 571-576.

MILLER, A.D., et G.J. ROSMAN. 1989. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Biotechniques* 7(9) : 980-982.

MILNE, D.M., L.E. CAMPBELL, D.G. CAMPBELL et D.W. MEEK. 1995. p53 is phosphorylated in vitro and in vivo by an ultraviolet radiation-induced protein kinase characteristic of the c-Junkinase, JNK1. *J. Biol. Chem.* 270(10) : 5511-5518.

MINDEN, A., A. LIN, F.-X. CLARET, A. ABO et KARIN, M. 1995. Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* 81(7) : 1147-1157.

MOLNAR, A., A.M. THEODORAS, L.I. ZON et J.M. KYRIAKIS. 1997. Cdc42Hs, but not rac1, inhibits serum-stimulated cell cycle progression at G1/S through a mechanism requiring p38/RK. *J. Biol. Chem.* 272(20) : 13229-13235.

NADEAU, A., G. GRONDIN et R. BLOUIN. 1997. In situ hybridization analysis of *ZPK* gene expression during murine embryogenesis. *J. Histochem. Cytochem.* 45(1) : 107-118.

OBERHAMMER, F.A., M. PAVELKA, S. SHARMA, R. TIEFENBACHER, A.F. PURCHIO, W. BURSCH et R. SCHULTE-HERMANN. 1992. Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor beta 1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89(12) : 5408-5412.

PAWSON, T. et G.D. GISH. 1992. SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell* 71(3) : 359-362.

PENDERGAST, A.M. 1996. Nuclear tyrosine kinases: from Abl to WEE1. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8 (2) : 174-181.

PHILIPSON, L. et V. SORRENTINO. 1991. From growth arrest to growth suppression. *J. Cell. Biochem.* 46(2) : 95-101.

RANA, A., K. GALLO, P. GODOWSKI, S.-I. HIRAI, S. OHNO, L. ZON, J.M. KYRIAKIS et J.A. AVRUCH. 1996. The mixed lineage kinase SPRK phosphorylates and activates the stress-activated protein kinase activator, SEK-1. *J. Biol. Chem.* 271(32) : 19025-19028.

REDDY, U.R. et D. PLEASURE. 1994. Cloning of a novel putative protein kinase having a leucine zipper domain from human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205(2) : 1494-1495.

SAWYERS, C.L., J. MCLAUGHLIN, A. GOGA, M. HAVLIK et O. WITTE. 1994. The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell* 77(1) : 121-131.

SHIELDS, J.M., R.J. CHRISTY et V.W. YANG. 1996. Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest. *J. Biol. Chem.* 271(33) : 20009-20017.

SORRENTINO, V., R. PEPPERKOK, R.L. DAVIS, W. ANSORGE et L. PHILIPSON. 1990. Cell proliferation inhibited by MyoD1 independently of myogenic differentiation. *Nature* 345(6278) : 813-815.

SUGARMAN, B., J., G.D. LEWIS, T.E. EESSALU, B.B. AGGARWAL et H.M. SHEPARD. 1987. Effects of growth factors on the antiproliferative activity of tumor necrosis factors. *Cancer Res.* 47(3): 780-786.

TERAMOTO, H., O.A. COSO, H. MIYATA, T. IGISHI, T. MIKI et J.S. GUTKIND. 1996. Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 271(44) : 27225-27228.

TIBBLES, L.A., Y.L. ING, F. KIEFER, J. CHAN, N. ISCONE, J.R. WOODGETT et N.J. LASSAM. 1996. MLK-3 activates the SAPK/JNK and p38/RK pathways via SEK1 and MKK3/6. *EMBO J.* 15(24) : 7026-7035.

VÄSTRIK, I., A. KAIPAINEN, T.-L. PANTTILA, A. LYMBOUSSAKIS, R. ALITALO, M. PARVINEN et K. ALITALO. 1995. Expression of the mad gene during cell differentiation in vivo and its inhibition of cell growth in vitro. *J. Cell. Biol.* 128(6) : 1197-1208.

WASKIEWICZ, A.J. et J.A. COOPER. 1995. Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7(6) : 798-805.

WATANABE, T., M. YANAGISAWA, N. MATSUBARA, M. OBINATA et Y. MATSUI. 1997. Assignment of the murine protein kinase gene DLK to chromosome 15 in the vicinity of the bt/Koa locus by genetic linkage analysis. *Genomics* 40(2) : 375-376.

XU, S., D. ROBBINS, J. FROST, A. DANG, C. LANGE-CARTER et M.H. COBB. 1995. MEKK1 phosphorylates MEK1 and MEK2 but does not cause activation of mitogen-activated protein kinase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92(15) : 6808-6812.

YAN, M., T. DAI, J.C. DEAK, J.M. KYRIAKIS, L.I. ZON, J.R. WOODGETT et D.J. TEMPLETON. 1994. Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. *Nature* 372(6508) : 798-800.

YU, G., T.E. SMITHGALL et R.I. GLAZER. 1989. K562 leukemia cells transfected with the human c-fes gene acquire the ability to undergo myeloid differentiation. J. Biol. Chem. 264(17) : 10276-10281.

ZHU, L., S. VAN DEN HEUVEL, K. HELIN, A. FATTAEY, M. EWEN, D. LIVINGSTON, N. DYSON, et E. HARLOW. 1993. Inhibition of cell proliferation by p107, a relative of the retinoblastoma protein. Genes Dev. 7(7A) : 1111-1125.